

# **Untersuchung der Auswirkungen einer Abcc6-Defizienz auf die Cholesterinhomöostase im Mausmodell**

Dissertation zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

**Fakultät für Chemie  
Universität Bielefeld**

vorgelegt von  
**Bettina Ibold**  
aus Berlin

Bielefeld/Bad Oeynhausen, im April 2018



Diese Arbeit entstand unter der Leitung von  
Prof. Dr. med. Cornelius Knabbe  
am Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin  
Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen  
Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum  
in Bad Oeynhausen  
in der Zeit von August 2014 bis April 2018.

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Cornelius Knabbe  
Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin,  
Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen  
Universitätsklinikum der Ruhr-Universität Bochum,  
Bad Oeynhausen
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Torben Lübke  
Arbeitsgruppe Biochemie I  
Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld

„Alles Wissen und alles Vermehren unseres Wissens endet nicht mit einem Schlusspunkt,  
sondern mit einem Fragezeichen.“

*Hermann Hesse (1877–1962)*

## Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. Cornelius Knabbe möchte ich mich bedanken für die Möglichkeit am Herz- und Diabeteszentrum zu promovieren und die Bereitstellung der interessanten Fragestellung, sowie für das Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Torben Lübke danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau Dr. rer. nat. Doris Hendig gilt mein besonderer Dank für die Betreuung dieser Arbeit und das entgegengebrachte Vertrauen eigene Ideen zu entwickeln und Projekte selbstständig umzusetzen.

Einen großen Dank möchte ich den Mitarbeitern der Zentralen Tierhaltung der Universität Bielefeld, im Besonderen Friedrich Krüger und Christiane Grebe, für die Zucht und Pflege der Mäuse und den Einsatz während meiner ersten Tierpräparationen aussprechen. Mein weiterer Dank in diesem Zusammenhang gilt Herrn Dr. Axel Ziesenis, als Leiter des Maushauses, für seine große Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Darüber hinaus danke ich den Mitgliedern der Selbsthilfegruppe für PXE-Erkrankte Deutschlands 1999 e.V. Die Mitgliederversammlungen haben mich für meine Forschungsarbeit im Labor durch die Bezugnahme zum Leben der PXE-Patienten motiviert. Ich möchte mich herzlich bei meinem ehemaligen Büroteam Dr. Isabel Faust, Dr. Imke Grimm und Christoph Lichtenberg bedanken für die vielseitige Hilfsbereitschaft und Unterstützung, sowie die wertvollen Diskussionen und Problembesprechungen in einer freundschaftlichen Atmosphäre.

Meinen ehemaligen Masterstudenten Bastian Fischer und René Kottkamp danke ich für den Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit. Weiterhin möchte ich mich bei meinen ehemaligen und gegenwärtigen Kolleginnen und Kollegen Christina Brandenburger, Dr. Mareike Dabisch-Ruthe, Dr. Jens Dreier, Dr. Jessika Dumke, Nina Garben, Franziska Knüttgen, Dr. Joachim Kuhn, Thanh-Diep Ly, Lara Riedel, Janina Tiemann, Dr. Tanja Vollmer, Katharina von Barga, Dr. Melanie Weinstock und allen weiteren Mitgliedern des Instituts für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin des Herz- und Diabeteszentrums Nordrhein-Westfalen für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Zuletzt gilt mein größter und ganz besonderer Dank meinen Liebsten um mich herum, meiner Familie und meinen Freunden. Danke für Eure großartige Unterstützung und Geduld, Eure warmherzige Bestärkung in meinem Tun, Eure Aufmunterung zur Fertigstellung dieser Arbeit und für das Korrekturlesen!

# Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung .....	1
	Abstract .....	2
2	Einleitung.....	3
2.1	Die Bindegewebserkrankung Pseudoxanthoma elasticum.....	3
2.1.1	Die Symptome der PXE-Erkrankung.....	3
2.1.2	Die Pathophysiologie der PXE-Erkrankung.....	5
2.1.3	Das <i>Abcc6-Knockout</i> -Mausmodell .....	6
2.1.4	Veränderungen des Lipidstoffwechsels bei einer PXE-Erkrankung.....	7
2.2	Die Cholesterinhomöostase .....	8
2.2.1	Die Cholesterinbiosynthese .....	8
2.2.2	Die Cholesterinabsorption.....	10
2.2.3	Der reverse Cholesterintransport .....	12
2.2.4	Die Apolipoproteine .....	13
2.2.5	Die Gallensäuresynthese.....	15
2.2.6	Die transkriptionale Regulation der Cholesterinhomöostase .....	16
2.3	Zielsetzung der Arbeit.....	17
3	Ergebnisse.....	18
3.1	Kalzifizierung der Vibrissenkapseln bei einer <i>Abcc6</i> -Defizienz .....	19
3.2	Veränderungen der Serumlipide bei einer <i>Abcc6</i> -Defizienz .....	20
3.2.1	Reduzierter Cholesteringehalt im Serum der <i>Abcc6</i> -defizienten Mäuse.....	20
3.2.2	Erniedrigte Konzentration pflanzlicher Sterine im Serum der <i>Abcc6</i> -defizienten Mäuse .....	24
3.3	Auswirkungen einer <i>Abcc6</i> -Defizienz auf den Lipoproteinstoffwechsel und die Cholesterinbiosynthese .....	28
3.3.1	Analyse von Genexpressionsprofilen mittels <i>RT<sup>2</sup> Profiler-PCR-Array</i> .....	28
3.3.2	Expressionsveränderungen von Genen des Lipoproteinsignal- und des Cholesterinstoffwechsels im Lebergewebe .....	28
3.3.3	Expressionsveränderungen von Genen des Lipoproteinsignal- und des Cholesterinstoffwechsels im Nierengewebe.....	29
3.3.4	Expressionsveränderungen von Genen des Lipoproteinsignal- und des Cholesterinstoffwechsels im weißen Fettgewebe.....	31
3.3.5	Verifikation der <i>PCR-Array</i> -Analyse im Leber-, Nieren- und Fettgewebe ....	33
3.3.6	Genexpressionsanalyse von Schlüsselenzymen der Cholesterinbiosynthese im Lebergewebe .....	35

3.3.7	Expressionsveränderung der Apolipoproteine bei einer <i>Abcc6</i> -Defizienz....	37
3.3.8	Expressionsanalyse der Transkriptionsfaktoren im Lebergewebe 12 Monate alter <i>Abcc6</i> -defizienter Mäuse .....	40
3.3.9	Untersuchung von lipoprotein-metabolisierenden Enzymen bei einer <i>Abcc6</i> -Defizienz.....	41
3.3.10	Modulation der <i>Pcsk9</i> -Expression bei einer <i>Abcc6</i> -Defizienz.....	44
3.3.11	Gen- und Proteinexpression von Cytochromen zur Untersuchung der hepatischen Gallensäuresynthese .....	45
3.4	Genexpressionsanalyse von ABC-Transportern im metabolisch aktiven Gewebe <i>Abcc6</i> -defizienter Mäuse .....	47
3.4.1	Genexpressionsanalyse der ABC-Transporter im Leber-, Nieren- und Fettgewebe 6 Monate alter <i>Abcc6</i> -defizienter Mäuse.....	47
3.4.2	Genexpressionsanalyse der ABC-Transporter im Leber-, Nieren- und Fettgewebe 12 Monate alter <i>Abcc6</i> -defizienter Mäuse.....	50
4	Diskussion .....	53
4.1	Erniedrigung der Serumlipide bei einer <i>Abcc6</i> -Defizienz.....	55
4.2	Erhöhung der hepatischen Cholesterinbiosynthese bei einer <i>Abcc6</i> -Defizienz ..	58
4.3	Reduktion der HDL-Biogenese und Erhöhung der VLDL-Synthese bei einer <i>Abcc6</i> -Defizienz .....	60
4.4	Erhöhte Genexpressionsrate von ABC-Transportern zur Cholesterinausscheidung bei einer <i>Abcc6</i> -Defizienz .....	65
4.5	Ausblick .....	69
5	Materialien .....	71
5.1	Chemikalien und Reagenzien .....	71
5.2	Puffer und Lösungen .....	72
5.3	Oligonukleotide .....	73
5.4	Kommerzielle Reaktionssysteme .....	77
5.5	Verbrauchsmaterialien .....	78
5.6	Längen- und Größenstandards .....	78
5.7	Antikörper .....	79
5.8	Geräte .....	79
5.9	Software und Datenbanken .....	80
6	Methoden.....	81



6.1	Maushaltung .....	81
6.2	Mauspräparation und Gewebelagerung .....	82
6.3	Molekularbiologische Methoden.....	82
6.3.1	Genotypbestimmung transgener Mäuse .....	82
6.3.2	Isolierung von Gesamt-RNA .....	84
6.3.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	84
6.3.4	Bestimmung der RNA-Integrität .....	84
6.3.5	Synthese der cDNA .....	85
6.3.6	Quantitative <i>real-time</i> PCR .....	85
6.3.7	Auswertung der quantitativen <i>real-time</i> PCR .....	87
6.3.8	Reinigung von PCR-Produkten.....	88
6.3.9	Sequenzierung von PCR-Produkten .....	88
6.3.10	Agarose-Gelelektrophorese .....	90
6.3.11	<i>RT<sup>2</sup> Profiler-PCR-Array</i> .....	90
6.4	Biochemische Methoden.....	91
6.4.1	Bestimmung der Lpl-Konzentration mittels ELISA.....	91
6.4.2	Konzentrationsbestimmung des oxLDL-Cholesterins mittels ELISA.....	92
6.4.3	Bestimmung Pcsk9-Konzentration mittels ELISA.....	92
6.4.4	Lcat-Aktivitätsmessung im Serum.....	92
6.4.5	Konzentrationsbestimmung des HDL- und LDL/VLDL-Cholesterins.....	92
6.4.6	Herstellung von Homogenaten aus Lebergewebe .....	93
6.4.7	BCA-Test zur Proteinkonzentrationsbestimmung.....	93
6.4.8	Bestimmung der Cyp27a1-Konzentration mittels ELISA .....	93
6.4.9	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	94
6.4.10	<i>Western-Blot-Analyse</i> .....	94
6.5	Histologische Methoden.....	94
6.5.1	Anfertigung von Gefrierschnitten.....	94
6.5.2	Alizarin-Rot-Färbung.....	95
6.6	Massenspektrometrie .....	95
6.6.1	Bestimmung der Apolipoproteine im Serum mittels Mikro-LC-MS/MS Methode .....	95
6.6.2	Bestimmung der Konzentration von freien und veresterten Sterinen mittels APPI-LC-MS/MS Methode .....	96
6.7	Statistische Analysen.....	97
7	Abkürzungsverzeichnis .....	98

8	Referenzen .....	99
9	Abbildungsverzeichnis .....	124
10	Publikationen und Präsentationen .....	126
11	Lebenslauf .....	127
12	Anhang.....	128
12.1	<i>RT<sup>2</sup> Profiler-PCR-Array</i> Daten .....	128
12.1.1	Lebergewebe.....	128
12.1.2	Nierengewebe .....	129
12.1.3	Weißes Fettgewebe.....	131
13	Erklärung.....	134

# 1 Zusammenfassung

Sequenzvariationen des Adenosintriphosphat-Bindungskassetten (ABC)-Transporter der Unterfamilie C, Mitglied 6 (*ABCC6*)-Gens können Pseudoxanthoma elasticum (PXE) verursachen, gehen aber auch mit Alterationen der Serumlipide und einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen einher. Die Klärung eines eindeutigen Zusammenhanges zwischen der physiologischen Funktion von *ABCC6*, dessen Transportsubstrat und den zellulären und metabolischen Veränderungen steht allerdings noch aus. Es gibt erste Hinweise aus Zellkulturstudien, dass in dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten eine Induktion der Cholesterinbiosynthese und Aktivitätssteigerung der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase (HMGCR) stattfindet. Auch viele andere Mitglieder der ABC-Transporterfamilie besitzen eine wichtige Rolle im Lipid- und Cholesterinstoffwechsel. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer *Abcc6*-Defizienz auf die Cholesterinhomöostase zu einem frühen und zu einem fortgeschrittenen Stadium einer PXE-Erkrankung durch eine vergleichende Analyse von 6 Monate und 12 Monate alten Wildtyp (Wt)- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen untersucht. Die absoluten Cholesterin- und Phytosterinkonzentrationen waren im Serum der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse beider Altersklassen erniedrigt. Die relative *Hmgcr*-Genexpression im Lebergewebe und das Verhältnis der Desmosterinkonzentration, ein Cholesterinvorläufer, zur totalen Cholesterinkonzentration im Serum der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse waren verglichen mit den Wt-Mäusen moderat erhöht. Ebenso wurde eine höhere Apolipoprotein (Apo)B-Konzentration im Serum der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen detektiert. Diese Beobachtungen deuten auf eine gesteigerte Cholesterinbiosynthese in den *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen hin und bestätigen die Ergebnisse der humanen Zellkulturstudien. Es wurden auch reduzierte Verhältnisse der Phytosterinkonzentrationen zum totalen Cholesteringehalt im Serum der 6 Monate und 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den Wt-Mäusen festgestellt. Dies lässt indirekt eine verminderte Lipidabsorption vermuten. Darüber hinaus wiesen die *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse einen geringeren *High-density lipoproteins* (HDL)-Cholesteringehalt im Serum auf sowie einen ApoA-I- und ApoA-II-Mangel. Die Phosphatidylcholin-Sterol-Acyltransferase-Aktivität, die für die Reifung der HDL-Partikel verantwortlich ist, war in den 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen geringfügig erniedrigt, jedoch in den 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen unverändert. Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse auf eine Störung der Biogenese von HDL-Partikeln des reversen Cholesterintransports bei einer *Abcc6*-Defizienz hin. Zudem konnte erstmalig eine Expressionssteigerung von ABC-Transportern, wie *Abcb1b*, *Abcb11*, *Abcg5* und *Abcg8*, die für eine Cholesterin- und Gallensäureausscheidung zuständig sind, im Lebergewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse beobachtet werden. Diese Induktion der ABC-Transporter-Genexpression und die reduzierten Sterinkonzentrationen im Serum der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse sind Anzeichen für eine verstärkte Lipidsekretion der Leber in die Galle. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine Funktion des *ABCC6*-Proteins im Transport von Lipiden hin und bekräftigen die Hypothese, dass *ABCC6* eine wichtige Rolle in der Cholesterinhomöostase spielt.

## Abstract

Sequence variants in the adenosine triphosphate-binding cassette (ABC)-Transporter subfamily C, member 6 (*ABCC6*) gene are responsible for Pseudoxanthoma elasticum (PXE), but are also correlated with altered serum lipids and an elevated risk to suffer from cardiovascular diseases. The unequivocal relationship between pathophysiological *ABCC6* function, as well as the substrate of *ABCC6*, and the cellular and metabolic alterations is still unsolved. There are first indications from cell culture studies with dermal fibroblasts of PXE patients showing an induction of cholesterol biosynthesis and an activity increase of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMGCR). Quite a number of members of the ABC transporter family have a pivotal role in lipid and cholesterol metabolism. In this study, the effects of an *Abcc6* deficiency on the cholesterol homeostasis was investigated for an early and a late disease stage of PXE via comparative analysis of 6-month-old and 12-month-old wildtype (Wt) and *Abcc6*<sup>-/-</sup> mice. The absolute cholesterol and phytosterol concentrations were lowered in serum of *Abcc6*<sup>-/-</sup> mice. The mRNA expression of *Hmgcr* was increased in liver tissue, as well as the ratio of the cholesterol precursor desmosterol concentration to cholesterol concentration in serum of *Abcc6*<sup>-/-</sup> mice relative to Wt mice. In addition, a higher apolipoprotein (Apo)B serum level in *Abcc6*<sup>-/-</sup> mice was detected. These observations indicate an enhanced cholesterol biosynthesis in *Abcc6*<sup>-/-</sup> mice, supporting previous studies. A decrease of phytosterol/cholesterol ratios in serum of 6-month-old and 12-month-old *Abcc6*<sup>-/-</sup> mice in comparison to Wt mice were also observed. This might be indicative of reduced lipid absorption. Furthermore, *Abcc6*<sup>-/-</sup> mice showed lower high-density lipoproteins (HDL) cholesterol serum concentration, and a lack of ApoA-I and ApoA-II as well. The activity of phosphatidylcholine-sterol acyltransferase, which is essential for maturing process of HDL particles, was modestly reduced in 6-month-old and unaltered in 12-month-old *Abcc6*<sup>-/-</sup> mice. These results may point to a disturbed biogenesis of HDL particles of reverse cholesterol transport due to *Abcc6* deficiency. An elevated gene expression of ABC transporters, like *Abcb1b*, *Abcb11*, *Abcg5* and *Abcg8*, which are responsible for cholesterol and bile acid secretion, in liver of *Abcc6*<sup>-/-</sup> mice was found. This gene induction of ABC transporter gene expression and reduced sterol concentrations in serum of the *Abcc6*<sup>-/-</sup> mice indicate increased lipid excretion from liver into the bile duct. Summarizing, the results of this study reinforce the hypothesis, that the *ABCC6* protein has a crucial role in cholesterol homeostasis, and therefore a function as lipid transporter is conceivable.

## 2 Einleitung

### 2.1 Die Bindegewebserkrankung Pseudoxanthoma elasticum

Pseudoxanthoma elasticum (PXE) ist eine seltene, autosomal rezessiv vererbare Erkrankung und charakterisiert durch eine progressive Kalzifizierung der elastischen Fasern im Bindegewebe, z.B. der Haut, der Augen und des Gefäßsystems [1]. Die Mineralisierungen dieser Fasern führen im weiteren Krankheitsverlauf zu deren Fragmentierung [2]. Es kommt zu morphologischen Veränderungen verschiedener Komponenten der extrazellulären Matrix, wie der Akkumulation von Proteoglykanen oder der Bildung abnormaler Elastin- oder Kollagenstrukturen [3,4]. PXE als Erkrankung präsentiert sich mit einem heterogenen Erscheinungsbild [5], was eine Diagnose erschwert. Bis heute gibt es keine eindeutigen Korrelationen zwischen dem Genotyp eines Patienten und dessen Phänotyp [6,7]. Die Prävalenz von PXE liegt laut Literatur zwischen 1 auf 25 000 und 1 auf 100 000 [5,8]. Frauen sind jedoch statistisch häufiger von PXE betroffen als Männer [5]. Im Jahr 2000 konnten als Ursache für PXE Mutationen im Adenosintriphosphat-Bindungskassetten (ABC)-Transporter der Unterfamilie C, Mitglied 6 (*ABCC6*)-Gen detektiert werden [9–11]. Seitdem wurden mehr als 300 verschiedene kausative Mutationen des *ABCC6*-Gens beschrieben [12]. Das *ABCC6*-Gen liegt auf Chromosom 16p13.1 [13,14], umfasst 31 Exons [13] und kodiert für ein 165 kDa schweres Protein, welches aus 1503 Aminosäuren besteht [15]. Das Substrat des *ABCC6*-Transporters ist bislang unbekannt [16]. Allerdings kommen anhand einer *in-silico*-Analyse vor allem Lipid- und Gallensäureverbindungen in Frage [17].

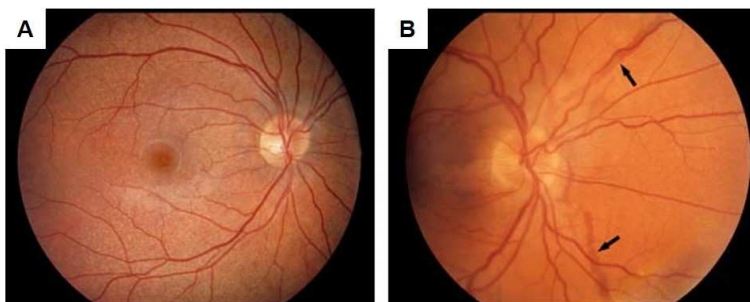
#### 2.1.1 Die Symptome der PXE-Erkrankung

Die ersten Krankheitssymptome von PXE betreffen gewöhnlich die Haut und treten im Jugendalter zwischen 10 und 15 Jahren auf [1,18]. Zunächst bilden sich kleine gelbliche Papeln auf der Haut, vor allem im Nacken bzw. seitlich am Hals und in den Regionen der Achseln, der Ellenbeugen und der Leiste (s. Abb. 1A, 1B und 1C) [19]. Bei Fortschreiten von PXE kommt es zur Bildung größerer lederartiger, faltiger Hautareale (s. Abb. 1B) [1,20].



**Abbildung 1: Symptome der Haut von PXE-Patienten.** Gezeigt sind A) gelbliche Papeln am Hals einer 36-jährigen PXE-Patientin, B) größeres lederartiges Hautareal am Hals/Nacken einer 50-jährigen PXE-Patientin und C) Falten der Achselhöhle eines 67-jährigen PXE-Patienten. Modifizierte Abbildung aus Plomp *et al.* [20].

Komplikationen an den Augen oder im Gefäßsystem entwickeln sich im Krankheitsverlauf zumeist erst im mittleren Lebensalter [21]. Zunächst bilden sich Pigmentunregelmäßigkeiten des Augenhintergrundes aus, die sogenannte *Peau d'orange* (s. Abb. 2A) [1]. Später manifestieren sich angioide Streifen der Retina (s. Abb. 2B) [22], die Brüche in der kalzifizierten Bruch-Membran darstellen [23]. Diese Läsionen können eine subretinale Neovaskularisation auslösen, einhergehend mit Einblutungen, Gewebsvernarbung und dem Verlust der Sehschärfe bis hin zur Erblindung des Patienten [22,24]. PXE korreliert mit einem erhöhten Risiko für das vorzeitige Auftreten von Gefäßerkrankungen [25,26]. Die Symptome im Gefäßsystem bei PXE äußern sich als *Claudicatio intermittens*, einem peripheren arteriellen Venenverschluss [25–27], als arterielle Hypertonie [28,29], oder vereinzelt als Myokardinfarkt in jungen Jahren [21]. Blutungen des gastrointestinalen oder urinalen Traktes treten verstärkt bei PXE-Patienten aufgrund fragiler Blutgefäße der Submukosa im Vergleich zur gesunden Bevölkerung auf [12]. Auch andere Organe können in seltenen Fällen von den Kalzifizierungen betroffen sein, wie die Nieren, die Milz, die Leber, das Brustgewebe und die Testikel [30–32]. Als klinisch relevant werden hierbei einzig die Mineralisierungen der Nieren eingestuft [12,33], da diese zur Bildung von Nierensteinen führen können [34,35].



**Abbildung 2: Veränderungen der Retina bei PXE.** Gezeigt sind A) Pigmentunregelmäßigkeiten des Augenhintergrundes (*Peau d'orange*) und B) angioide Streifen (schwarze Pfeile) eines PXE-Patienten. Modifizierte Abbildung aus Plomp *et al.* [20].

### 2.1.2 Die Pathophysiologie der PXE-Erkrankung

In der Literatur werden zwei Hypothesen zur Erklärung der Pathophysiologie von PXE diskutiert, die metabolische Hypothese und die zelluläre Hypothese. Die metabolische Hypothese geht bei PXE von einer systemischen Stoffwechselerkrankung aus [36]. Die Hepatozyten der Leber exprimieren das ABCC6-Protein am stärksten, gefolgt vom Nierengewebe [37–40]. Die Leber ist bei dem Großteil der PXE-Patienten nicht von den Symptomen betroffen [41]. Die ABCC6-Expression der basolateralen Hepatozytenmembran sowie der proximalen Nierentubulimembran lassen eine Funktion beim Rücktransport von intrazellulären Molekülen ins Blut vermuten [37,39,42]. Im Gegensatz dazu weisen die von den PXE-Symptomen betroffenen Gewebe kaum eine oder keine ABCC6-Expression auf [9,43]. In der Theorie der metabolischen Hypothese entsteht in Folge des ABCC6-Funktionsverlustes in der Leber ein Mangel eines oder mehrerer unbekannter Faktoren in der Zirkulation, die möglicherweise als Kalzifizierungsinhibitoren dienen [21]. Es kommt so zu progressiven Kalzifizierungen in den extrahepatischen Geweben. Gestützt wird diese Theorie von der Entdeckung wirksamer Kalzifizierungsinhibitoren in der Zirkulation wie Fetuin A und Matrix-Gla-Protein [44,45], die im Blut von PXE-Patienten erniedrigt vorliegen [46,47]. PXE ist außerdem von einer langsamen und kontinuierlichen Mineralisierung des Bindegewebes gekennzeichnet, was auf eine metabolische Störung schließen lässt [29]. Darüber hinaus führte eine Inkubation dermalen Fibroblasten von gesunden Probanden mit dem Serum von PXE-Patienten in Zellkulturexperimenten zu einer veränderten Elastinexpression und der Bildung abnormer Strukturen der elastischen Fasern [48]. In Parabioseexperimenten, bei denen sich eine *Abcc6-Knockout* (*Abcc6*<sup>-/-</sup>)-Maus und eine Wildtyp (Wt)-Maus einen gemeinsamen Blutkreislauf teilten, wurde gezeigt, dass die *Abcc6*-defiziente Maus, entgegen ihres eigentlichen Phänotyps, weniger Kalzifizierungen entwickelte. Diese Beobachtung wurde auf einen anti-mineralisierenden Faktor aus der Zirkulation der gesunden Maus zurückgeführt [49].

Die andere Theorie zur Pathogenese von PXE ist die zelluläre Hypothese. Diese beschreibt, dass der Verlust des ABCC6-Proteins einen lokalen und direkten Einfluss auf die Physiologie der von den Symptomen betroffenen Regionen und konsequenterweise auf die dort lokalisierten Zellen hat. Zu den betroffenen Zellen zählen unter anderem die dermalen Fibroblasten, deren Expressionsprofil, Adhäsionseigenschaften, Zell-Zell-, Zell-Matrix-Interaktionen und Proliferationsverhalten sich durch das Fehlen des ABCC6-Proteins verändern [43,50]. Ebenso wurde eine erhöhte Synthese von Proteoglykanen und Elastin sowie eine verstärkte Aktivität der Matrix-Metalloproteinase (MMP) 2 beobachtet [51–53]. Zudem wurden höhere Konzentrationen der MMP 2 und 9 im Serum [54] sowie höhere Konzentrationen von Abbauprodukten des Elastins im Plasma

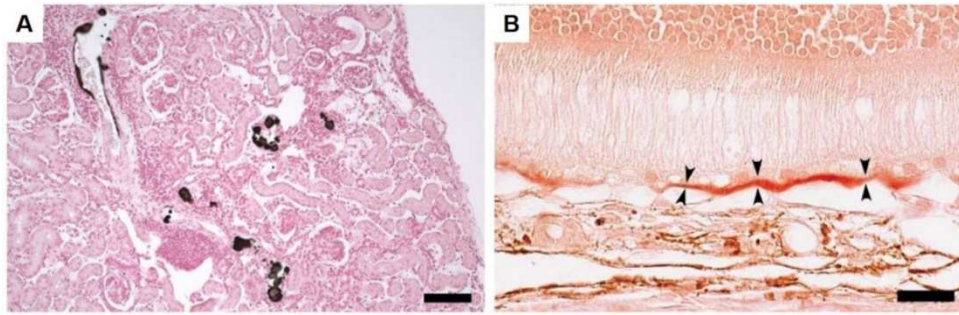
von PXE-Patienten quantifiziert [55]. Diese Hypothese stützend wurden histopathologisch in der Ultrastruktur von elastischen Fasern der Haut von PXE-Patienten morphologische Veränderungen beobachtet, noch bevor Kalzifizierungen zu detektieren waren [56,57].

### 2.1.3 Das *Abcc6-Knockout-Mausmodell*

Detaillierte Einblicke und viele experimentelle Daten über die Pathogenese von PXE wurden anhand zweier etablierter Mausmodelle gewonnen [12,39,58]. In dem erzeugten *Knockout*-Modell aus der Arbeitsgruppe von Klement *et al.* wurden mittels homologer Rekombination die Exons 15 bis 18, inklusive der flankierenden Introns 14 und 18, der *Abcc6*-DNA-Sequenz durch ein Neomycin/G418-Resistenzgen ersetzt. In diesem transgenen *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mausmodell wurden Mineralisierungen an der Kapsel der Vibrissen, in den Gefäßwänden mittelgroßer Arterien, in der Haut, in den Drüsen der Retina, in den Tubuli der Niere und in dem interskapulären braunen Fettgewebe im Vergleich zu den Wt-Mäusen festgestellt. Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie wurden auch Kalzifizierungen, die mit Kollagen- und Elastinfasern assoziiert waren sowie abnormale Elastinaggregate [58], ähnlich zu den Veränderungen in den Hautbiopsien der PXE-Patienten [56], beobachtet. Als früher Marker eines *Abcc6-Knockouts* wurden Calciumablagerungen der Vibrissenkapseln herangezogen, da die Bindegewebsstrukturen dieser Kapseln schon ab der 6. Lebenswoche konsistent in den *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen kalzifizierten. Die detektierbaren Mineralisierungen nahmen mit dem Alter der Mäuse zu [58]. Im Allgemeinen wiesen die *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse jedoch einen weniger heterogenen Phänotyp als die PXE-Patienten auf, was auf eine genetische Homogenität sowie auf homogenere Umwelt- und Ernährungsbedingungen einer Mäusezucht zurückzuführen ist.

Parallel zu diesem *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Modell hat die Arbeitsgruppe um Gorgels *et al.* 2005 ein zweites Mausmodell mit Hilfe der homologen Rekombination generiert. In diesem Fall wurden die Exons 16, 17 und große Teile von Exon 18 durch ein Hygromycin-Resistenzgen ausgetauscht. Diese *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten ab dem 6. Lebensmonat Kalzifizierungen in den mittelgroßen Blutgefäßen der Niere, vor allem des Nierenkortexes (s. Abb. 3A), entlang der elastischen Fasern innerhalb der Gefäßwände.





**Abbildung 3: Paraffinschnitte der Niere und des Auges einer 17 Monate alten *Abcc6*-defizienten Maus.** Gezeigt sind A) Von-Kossa-Färbung eines Nierenschnittes mit Kalzifizierungen (schwarze Färbung) der Blutgefäße im Nierenkortex, Bar 100 µm und B) Alizarin-Rot-Färbung eines Augenschnittes mit Kalzifizierungen (rote Färbung) in der Bruch-Membran (zwischen den Pfeilspitzen), Bar 20 µm. Modifizierte Abbildung aus Gorgels *et al.* [39].

Mit steigendem Lebensalter der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse nahmen die Mineralisierungen zu, sodass Ablagerungen in den Gefäßwänden kleiner Gefäße und Kapillare ins Gefäßlumen hineinragten und auch größere Blutgefäße betroffen waren [39]. Diese Ergebnisse korrespondieren mit den Befunden von PXE-Patienten, die aufgrund von Mineralisierungen der arteriellen Blutgefäße an einer *Claudicatio intermittens* leiden [1,15]. PXE-Erkrankte zeigten zudem auch arterielle Kalzifizierungen innerer Organe wie der Niere, vor allem kleiner und mittelgroßer Blutgefäße [15,30,59,60]. Bei der Untersuchung älterer *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse, zwischen 17 und 19 Monate alt, wurden auch in vielen anderen Organen Mineralisierungen dokumentiert. Hierbei wurden Calciumablagerungen in den Gefäßwänden der *Vena Cava*, der *Aorta Dorsalis* und anderen koronaren Arterien detektiert [39]. In der Literatur findet sich ebenso ein klinischer Fallbericht eines PXE-Patienten, der die Beobachtung von Mineralisierungen in der *Aorta* und *Vena Cava* beschreibt [3]. In der Haut der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse konnten keine Kalzifizierungen an den elastischen Fasern festgestellt werden, nur in den Blutgefäßen, die die Haut durchziehen [39]. Die *Abcc6*-Knockout-Mäuse entwickelten zudem Kalzifizierungen sowie veränderte Elastin- und Kollagenfaserstrukturen in der Bruch-Membran des Auges (s. Abb. 3B) [39,61]. Vergleichbare Veränderungen konnten in der Bruch-Membran von PXE-Patienten gezeigt werden [3,62,63]. Die beiden vorgestellten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Modelle sind demnach geeignete Tiermodelle zur Untersuchung der Pathophysiologie von PXE.

#### 2.1.4 Veränderungen des Lipidstoffwechsels bei einer PXE-Erkrankung

Im Zusammenhang mit dem Lipidstoffwechsel wurden *ABCC6*-Sequenzvariationen entdeckt, die mit einem veränderten *High-density lipoproteins* (HDL)-Cholesterin und Triglyzeridgehalt im Blut korrelieren [64], jedoch kein PXE verursachen [65,66]. Es sind gleichermaßen Polymorphismen des *ABCC6*-Gens bekannt, die mit einem geringeren

HDL-Cholesterin und einem erhöhten Risiko für koronare Herzkrankheiten einhergehen [67,68]. Im Plasma der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse konnten bereits reduzierte Konzentrationen an Gesamt- und HDL-Cholesterin detektiert werden [39]. Es wurde am *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mausmodell auch belegt, dass eine präventive Behandlung mit Atorvastatin Kalzifizierungen peripherer Organe verhindern kann. Der zugrundeliegende Mechanismus, inwiefern eine Inhibition der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl (HMG)-Coenzym A (CoA)-Reduktase (HMGCR) eine Mineralisierung unterbindet, konnte allerdings nicht im Detail aufgeklärt werden [69]. Unterstützend dazu wurde in Zellkulturexperimenten eine erhöhte HMGCR-Aktivität in dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten verglichen mit Fibroblasten von gesunden Probanden festgestellt [70]. Andere Zellkulturstudien mit immortalisierten Hepatozyten zeigten, dass der *ABCC6*-Promotor eine Bindungsstelle für den hepatozytären nukleären Faktor 4α (HNF4α) besitzt und durch diesen aktiviert wird [71,72]. Der Transkriptionsfaktor HNF4α reguliert viele metabolische Prozesse in der Leber, unter anderem die Lipidhomöostase [73,74].

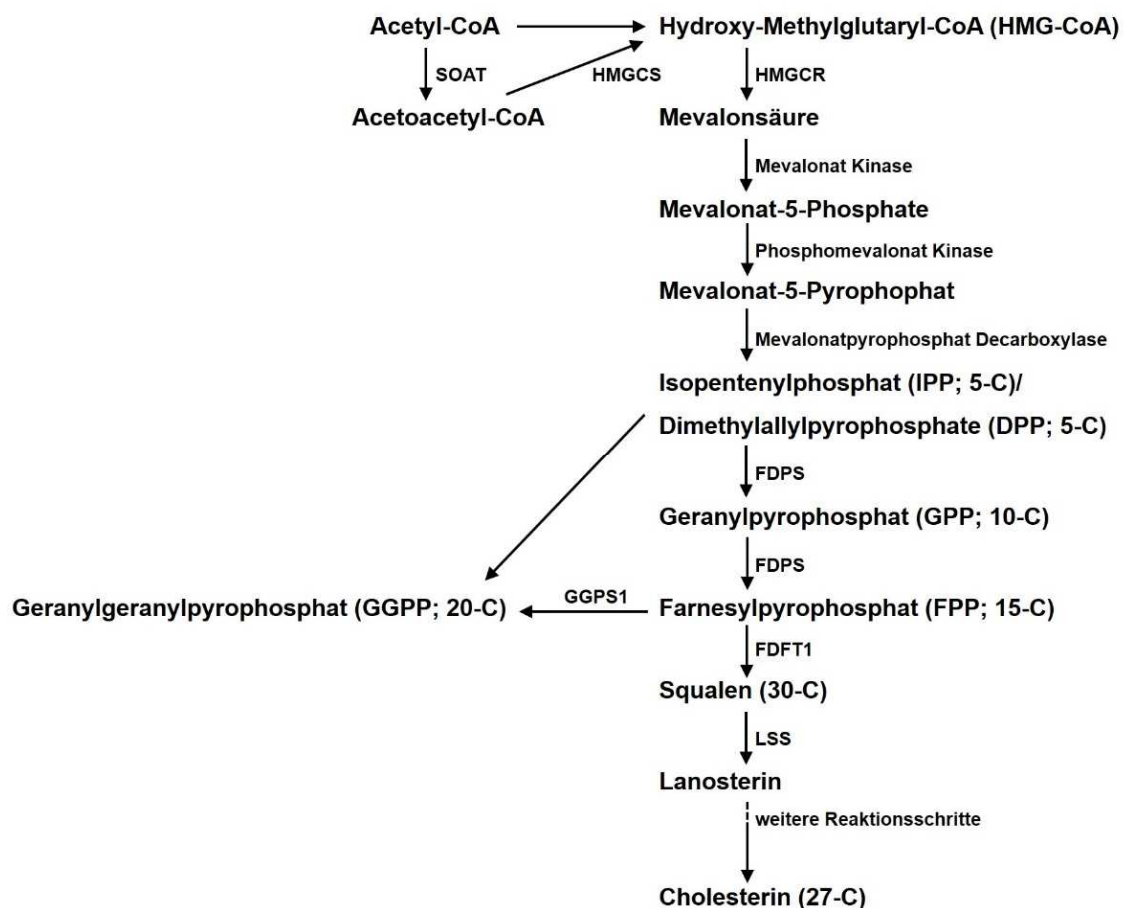
## 2.2 Die Cholesterinhomöostase

Cholesterin besitzt wichtige strukturelle und metabolische Funktionen im Körper. Es ist ein essentieller Zellmembranbestandteil und reguliert die Fluidität und Permeabilität der Membran, beispielsweise durch Bildung sphingolipidreicher Domänen, den *Lipids Rafts* [75]. Die Cholesterinbiosynthese liefert zudem Isoprenoide für die Proteinprenylierung [76]. Das Cholesterin selbst dient als Ausgangsmolekül für die weitere Steroidhormonsynthese [77] sowie für die Bildung von Ko-Faktoren, Vitaminen und Gallensäuren [78]. Auf der anderen Seite jedoch können zu hohe Cholesterinkonzentrationen im Blut pathologische Folgen, wie die Entstehung einer Atherosklerose, begünstigen [79]. Die Cholesterinhomöostase wird durch ein komplexes Netzwerk gesteuert, um die Verfügbarkeit von Cholesterin für den gesamten Organismus zu koordinieren. Vor allem die Leber ist für die Aufrechterhaltung dieser Homöostase [80] unter Zuhilfenahme verschiedenster Mechanismen verantwortlich. Zu diesen Mechanismen zählen die *de-novo*-Cholesterinbiosynthese, die rezeptorvermittelte Cholesterinaufnahme, die Lipoproteinsekretion ins Blut, der Cholesterinabbau mittels Gallensäuresynthese und die Cholesterinspeicherung als Cholesterinester, der biologisch inaktiven Form von Cholesterin, in *Lipid-Droplets* und Membranen [78,81,82].

### 2.2.1 Die Cholesterinbiosynthese

Ein Teil des im Körper synthetisierten Cholesterins wird in der Leber hergestellt [78]. Die Cholesterinbiosynthese ist ein komplexer Prozess mit mehr als 30 verschiedenen Reaktionen in unterschiedlichen Zellkompartimenten, an denen mehr als 15 Enzyme be-

teiligt sind [83]. Zusammengefasst ist die Cholesterinbiosynthese die Kondensation von Isoprenoiden in mehreren Reaktionen zu Squalen. Das Squalen wird anschließend durch Zyklisierung zu Lanosterin umgebaut, welches letztendlich zu Cholesterin prozessiert wird [84] (s. Abb. 4).



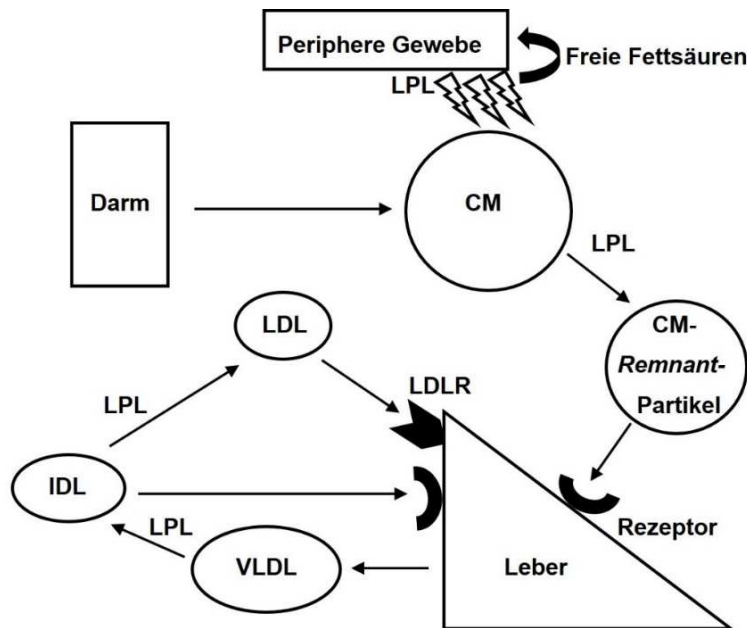
**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Cholesterinbiosynthese.** Übersicht der wichtigsten Schritte des Mevalonatweges innerhalb der Cholesterinbiosynthese mit numerischer Angabe der C-Atome der einzelnen Isoprenoiden. 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl = HMG; Coenzym A = CoA; SOAT = Sterol-O-Acyltransferase; HMGCS = HMG-CoA-Synthase; HMGCR = HMG-CoA-Reduktase; FDPS = Farnesylpyrophosphatsynthase; GGPS1 = Geranylgeranylpyrophosphatsynthase 1; FDFT1 = Squalensynthase (auch Farnesylidiphosphat-Farnesyltransferase 1); LSS = Lanosterinsynthase.

Im Detail beginnt die Cholesterinbiosynthese mit der Formation des HMG-CoA aus zwei Molekülen Acetyl-CoA, katalysiert durch die Enzyme Sterol-O-Acyltransferase (SOAT) und HMG-CoA-Synthase (HMGCS) [84]. Das HMG-CoA wird durch die HMGCR zu Mevalonsäure reduziert. Die HMGCR ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym dieses Stoffwechselweges [85], dessen Aktivität am stärksten reguliert wird [78]. Die Mevalonsäure wird zweimal mittels Mevalonatkinase und Phosphomevalonatkinase

phosphoryliert und es entsteht Mevalonat-5-Pyrophosphat [86,87]. Das Mevalonat-5-Pyrophosphat wird durch die Pyrophosphomevalonat Decarboxylase in das aktive Isoprenoid Isopentenylpyrophosphat (IPP) und dessen Isomer Dimethylallylpyrophosphat (DPP) überführt [86]. Die Farnesylpyrophosphatsynthase (FDPS) katalysiert die sequenzielle Kondensationsreaktion von zwei Molekülen IPP zu Geranylpyrophosphat (GPP) und prozessiert dieses weiter zu Farnesylpyrophosphat (FPP) durch Kondensation eines DPP-Moleküls. Es entsteht daraufhin Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) mit Hilfe der Geranylgeranylpyrophosphatsynthase 1 (GGPS1) unter Verwendung eines weiteren Moleküls IPP. Die Isoprenoide FPP und GGPP können an dieser Stelle aus dem Stoffwechselweg geschleust und zur post-translationalen Modifikation, der Prenylierung von Proteinen, genutzt werden [76]. Es werden kleine G-Proteine der Signaltransduktion, wie die Ras-, Rab- und Rho-Proteine, zur Verankerung in der Zellmembran prenyliert [88,89]. Die letzte Reaktion zur Bildung von Squalen wird von der Squalensynthase (auch Farnesyldiphosphat-Farnesyltransferase 1; FDFT1), unter Einbeziehung von zwei Molekülen FPP, katalysiert (s. Abb. 4). Das Enzym FDFT1 dient als weiterer wichtiger Schlüsselpunkt zur Regulation der Cholesterinbiosynthese [83,90]. Das Squalen zyklisiert über das Zwischenprodukt Monoepoxy-Squalen [91] anschließend zu Lanosterin, einem Viererringsystem, mit Hilfe der Lanosterinsynthase (LSS). Die Umwandlung von Lanosterin in Cholesterin erfolgt in weiteren Umlagerungs- und Eliminationsreaktionen [92,93].

### 2.2.2 Die Cholesterinabsorption

Die Cholesterinabsorption ist definiert als der Transfer des Cholesterins von der intraluminalen auf die intestinale Seite der Lymphgefäße in den *Ductus thoracicus* [81]. Diese Absorption beginnt schon im Magen, allerdings findet die eigentliche Absorption im *Duodenum* und im *Jejunum* mit Hilfe von Gallensäuren und pankreatischen Enzymen statt [94]. Auch die mit der Nahrung aufgenommenen Stoffe nehmen Einfluss auf die Effizienz der Cholesterinabsorption. So reduzieren Phytosterine und Fischöle die Absorption von Cholesterin [95,96]. Cholesterin ist ein nahezu wasserunlöslicher Stoff und daher ist dessen Absorption abhängig von den solubilisierenden Eigenschaften der Gallensäuren [97,98]. Diese sind natürliche amphipathische Detergenzien, welche Mizellen formen können und somit Lipide lösbar machen [99]. Cholesterin wird von den Enterozyten aufgenommen und zum weiteren Transport über die Lymphe ins Blut in Chylomikronen (CM) eingebaut [81]. Die ebenfalls in den CM enthaltenen Triglyzeride werden über die Lipoproteinlipase (LPL), die auf der Oberfläche von Endothelzellen exponiert ist, hydrolysiert und ins periphere Gewebe aufgenommen, beispielsweise in die Adipozyten des weißen Fettgewebes zur Speicherung (s. Abb. 5) [100].



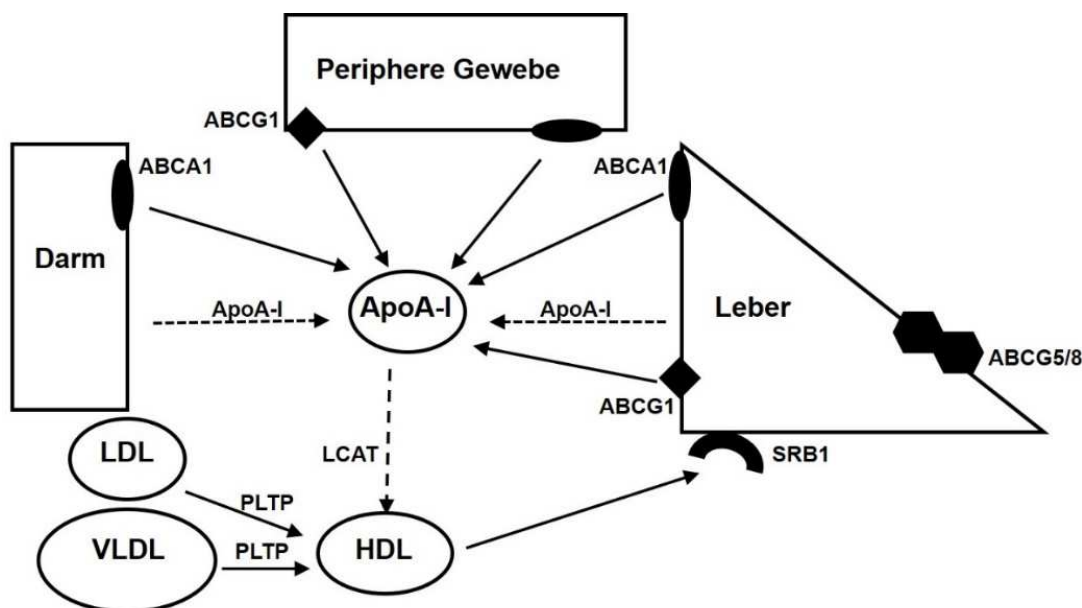
**Abbildung 5: Schematische Darstellung der intestinalen Cholesterinabsorption und der Cholesterinverteilung über das Blut zur Leber.** Die Enterozyten des Darms absorbieren Nahrungslipide wie Cholesterin und bauen diese für den weiteren Transport in Chylomikronen (CM) ein. Die am Endothel gebundene Lipoproteinlipase (LPL) hydrolysiert die Triglyzeride der CM zur Aufnahme als freie Fettsäuren in die peripheren Gewebe. Es entstehen CM-Remnant-Partikel, welche von der Leber rezeptorvermittelt aufgenommen werden. Intrahepatische Lipide werden in *Very-low-density lipoproteins* (VLDL) eingebaut und erneut in die Zirkulation sekretiert, wo sie als Substrat der LPL dienen. Die VLDL-Partikel werden zu *Intermediate-density lipoproteins* (IDL) hydrolysiert und entweder von der Leber aufgenommen oder weiter zu *Low-density lipoproteins* (LDL) prozessiert. Die Konzentration des LDL-Cholesterins in der Zirkulation wird primär von der Leber über eine LDL-Rezeptor (LDLR)-vermittelte Aufnahme der Partikel reguliert.

Die entstandenen cholesterinreichen *Remnant*-Partikel werden dann, vermittelt durch den *Low-density lipoproteins* (LDL)-Rezeptor (LDLR), in die Hepatozyten aufgenommen. Das enthaltene Cholesterin wird entweder der Gallensäuresynthese zugeführt oder in *Very-low-density lipoproteins* (VLDL) eingebaut, um erneut in die Zirkulation sekretiert zu werden (s. Abb. 5) [101]. Die VLDL-Partikel werden mittels LPL zu *Intermediate-density lipoproteins* (IDL) hydrolysiert und entweder von der Leber aufgenommen oder weiter zu LDL prozessiert [100]. Eine Konzentrationserhöhung dieses LDL-Cholesterins im Blut ist als wesentlicher Grund für die Entwicklung atherosklerotischer Erkrankungen identifiziert worden [102,103]. Die Konzentration des LDL-Cholesterins in der Zirkulation kann primär von der Leber, aber auch von den peripheren Geweben über eine LDLR-vermittelte Aufnahme der Partikel ausgeglichen werden [104]. Daher stellt die Regulation dieses Rezeptors auch einen zentralen Punkt des Cholesterinimports dar [81]. Goldstein und Brown erhielten 1985 den Nobelpreis in Physiologie oder Medizin für die Entdeckung, dass Mutationen des *LDLR*-Gens ursächlich für familiäre Hypercholesterinämie verantwortlich sind [105]. Der Komplex aus LDLR und LDL-Partikel wird mittels

Endozytose aufgenommen (s. Abb. 5). Nach Lösen der Rezeptor-Liganden-Bindung unter sauren Bedingungen kann der LDLR entweder im Lysosomen abgebaut oder an die Zelloberfläche zurücktransportiert werden [106]. Dieser Prozess wird entscheidend beeinflusst von dem in der Zirkulation vorkommenden Proprotein-konvertase Subtilisin/Kexin Typ 9 (PCSK9) [107,108]. Es bindet an den LDLR auf der Hepatozytenoberfläche und induziert dessen Abbau [109,110]. PCSK9 wird im Wesentlichen von der Leber exprimiert und nach der Prozessierung ins Blut sekretiert [111].

### 2.2.3 Der reverse Cholesterintransport

Eine übermäßige Cholesterinakkumulation ist toxisch für Zellen und soll durch einen reversen Cholesterintransport von den peripheren Geweben zur Leber hin verhindert bzw. reduziert werden. Dieser Rücktransport wird von den HDL-Partikeln vermittelt [100,112] und ist essentiell, da nur Hepatozyten und hormonproduzierende Zellen Cholesterin metabolisieren können [100]. Der Ausgangspunkt für die *de-novo*-Biogenese von HDL-Partikeln ist die Sekretion eines Lipidakzeptors, dem Apolipoprotein (Apo) A-I, vornehmlich von der Leber (s. Abb. 6) [78].



**Abbildung 6. Schematische Darstellung des reversen Cholesterintransports.** Der reverse Cholesterintransport beginnt mit der Biogenese von *High-density lipoproteins* (HDL). Ausgangspunkt ist die Sekretion des lipidarmen Lipidakzeptors Apolipoprotein A-I (ApoA-I) sowie dessen Interaktion mit dem ATP-Bindungskassetten (ABC)-Transporter ABCA1. Der Cholesterinefflux auf bereits lipidbeladene ApoA-I-Proteine wird durch den ABC-Transporter ABCG1 vermittelt. Die Enzymaktivitäten der Phosphatidylcholin-Sterol-Acyltransferase (auch Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase; LCAT) und des Phospholipid-Transferprotein (PLTP) sind essentiell für die Reifung der HDL-Partikel. PLTP überträgt Phospholipide von *Low-density lipoproteins* (LDL) und *Very-low-density lipoproteins* (VLDL) auf HDL-Partikel. Die reifen HDL-Partikel werden zur Leber transportiert und primär mit Hilfe des *Scavenger*-Rezeptors B1 (SRB1) aufgenommen. Das in den HDL-Partikeln enthaltene Cholesterin kann durch die Transporter ABCG5 und ABCG8 in den Gallengang ausgeschieden werden.

Entscheidend für einen Cholesterinefflux ist die Wechselwirkung des ApoA-I-Proteins mit dem ABC-Transporter ABCA1 auf der Zelloberfläche [113,114]. Die Leber hat den größten Anteil an der Entstehung von HDL-Partikeln [114], aber auch die peripheren Gewebe spielen eine bedeutende Rolle [115–117]. Die ins Blut entlassenen unreifen ApoA-I-HDL-Komplexe bestehen aus Phospholipiden und freiem Cholesterin. Das freie Cholesterin fungiert als Substrat für die plasmatische Phosphatidylcholin-Sterol-Acyltransferase (auch Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase; LCAT) zur Cholesterinveresterung [114]. Es kommt zur Reifung der HDL-Partikel [118]. Ein weiterer ABC-Transporter ABCG1 trägt zum Cholesterinefflux aus den Zellen bei [78,119]. Allerdings kann ABCG1 nur mit bereits lipidbeladenen ApoA-I-Proteinen interagieren [119,120]. Das ABCG1 wird, genau wie ABCA1, von der Leber und den extrahepatischen Geweben exprimiert [121]. Das Enzym Phospholipid-Transferprotein (PLTP) im Blut trägt zur weiteren HDL-Reifung bei, indem es Phospholipide von ApoB-haltigen VLDL- und LDL-Partikeln auf die HDL-Partikel überträgt (s. Abb. 6) oder die Fusion kleinerer HDL-Partikel vermittelt [122]. Die reifen HDL-Partikel werden zur Leber zurücktransportiert, wo 65 % aller Cholesterinester der HDL-Partikel über den *Scavenger*-Rezeptor B1 (SRB1; Genname: *SCARB1*) aufgenommen werden [123]. Das veresterte Cholesterin wird in den Hepatozyten enzymatisch wieder zu freiem Cholesterin umgebaut [78] und entweder direkt in die Galle zur Exkretion transportiert oder der Gallensäuresynthese zugeführt [124–126]. Auch bei der Exkretion sind ABC-Transporter von großer Bedeutung. Die Transporter ABCG5 und ABCG8 transportieren das Cholesterin in den Gallengang [127]. In den Enterozyten schleusen ABCG5 und ABCG8 Sterine wieder ins Darmlumen, um so bereits die Absorption zu unterbinden [94].

#### 2.2.4 Die Apolipoproteine

Die Apolipoproteine sind ein essentieller Bestandteil von Lipoproteinen und besitzen lipid-komplexierende Eigenschaften, um Lipoproteine zu stabilisieren und einen Transport lipophiler Stoffe zu ermöglichen [128]. Sie vermitteln außerdem die zelluläre Aufnahme von Lipoproteinkomplexen, indem sie mit den entsprechenden Rezeptoren wechselwirken. Sie dienen als Lipidakzeptoren und ebenso als Ko-Faktoren von Enzymen [81,129]. Ein Lipoproteinpartikel kann verschiedene Apolipoproteine enthalten. Zusätzlich findet zwischen den Lipid- und Proteinkomponenten der Lipoproteine ein ständiger Austausch in der Zirkulation statt. Es sind mindestens 15 verschiedene Apolipoproteine beschrieben worden [128]. Das ApoA-I ist vor allem ein strukturelles und funktionales Protein der HDL-Partikel und macht dort 70 % des Proteinanteils aus [130]. Die Hauptfunktionen des ApoA-I sind die Interaktion mit verschiedenen zellulären Rezeptoren wie dem HDL-Rezeptor SRB1, die Aktivierung der LCAT und das Fungieren

als Lipidakzeptor für überschüssiges Cholesterin aus extrahepatischen Geweben zur Biogenese von HDL-Partikeln [131]. ApoA-I ist auch auf CM und VLDL zu finden und wird vorherrschend vom Darm und der Leber gebildet, ebenso wie das ApoA-II. ApoA-II ist das zweitwichtigste Strukturprotein der HDL und in 50 % dieser Partikel zu finden [132]. Das ApoA-IV kann auch Bestandteil der HDL-Partikel sein. Es spielt aber eine entscheidendere Rolle bei der Entstehung und Sekretion der CM im Darm, wo es selbst vornehmlich exprimiert wird [133]. Die Mitglieder der Apolipoprotein-Familie C werden primär in der Leber gebildet. Das kleinste Mitglied ApoC-I ist sowohl mit HDL als auch mit VLDL assoziiert und dient ebenfalls als Aktivator der LCAT, kann jedoch inhibierend auf die Hepatische Lipase (LIPC) wirken. ApoC-II aktiviert im Gegensatz zu ApoC-I verschiedene Lipasen wie die plasmatische LPL und ist ebenfalls Bestandteil der HDL- und VLDL-Partikel [134]. Das dritte Mitglied der Proteinfamilie, ApoC-III, ist indes überwiegend in VLDL und nur zum kleinen Teil in HDL enthalten. Dieses Protein inhibiert die LPL- und LIPC-Aktivität und reduziert die Aufnahme der CM in die Hepatozyten [135]. Eine weitere Schlüsselkomponente der HDL-Partikel ist das ApoE, da es auch eine *de-novo*-HDL-Biogenese bewirken kann [136]. Der ApoE-Gehalt ist jedoch in den HDL wesentlich geringer als der ApoA-I-Gehalt [137]. Der Hauptteil der zirkulierenden ApoE-Proteine hingegen kommt in triglyzeridreichen Lipoproteinen, den CM, VLDL, IDL und LDL, vor. Dort vermittelt es als Ligand eine Aufnahme über Rezeptoren der LDL-Rezeptor-Familie. ApoE wird von verschiedenen Geweben synthetisiert, einschließlich der Leber und dem endokrinen System [134]. Eine Sonderrolle nimmt das ApoB ein, da es zwei Transkript-varianten gibt, die gewebespezifisch exprimiert werden [138]. Das *ApoB*<sub>100</sub>-Transkript enthält die vollständige kodierende Gensequenz von *ApoB* [139] und wird im Lebergewebe gebildet, wo es die VLDL-Bildung und -Sekretion unterstützt [140]. Es ist überdies in IDL- und LDL-Partikel vorhanden [100]. ApoB<sub>100</sub> fungiert als LCAT-Aktivator und als Ligand für den LDLR [141,142]. Es ist notwendig für eine effektive LDL-Cholesterinelimination aus dem Blut, da LDL-Partikel ausschließlich das ApoB<sub>100</sub> enthalten [143]. Die verkürzte Isoform ApoB<sub>48</sub> wird nur in den Enterozyten des Darms hergestellt und ist dementsprechend an der Bildung und Sekretion der CM beteiligt [144]. ApoB<sub>48</sub> ist damit essentiell für die Resorption von Nahrungslipiden und lipidlöslichen Vitaminen [128]. Im Gegensatz zu ApoB<sub>100</sub> ist ApoB<sub>48</sub> nicht an einer LDLR-vermittelten Lipoproteinaufnahme beteiligt, bedingt durch das Fehlen der LDLR-Erkennungsdomäne nach der Prozessierung [139].



## 2.2.5 Die Gallensäuresynthese

Zur Aufrechterhaltung der Cholesterinhomöostase kann überschüssiges Cholesterin in wasserlösliche Gallensäuren überführt werden und in den enterohepatischen Kreislauf gelangen. Die neu synthetisierten Gallensäuren werden über den Gallengang ins Darmlumen geschleust, wo sie wiederum für die Absorption von Cholesterin, anderen Nahrungslipiden und fettlöslichen Vitaminen essentiell sind, und gelangen mittels Lipoproteine erneut in die Leber [145]. Das Cholesterin kann ebenso, ohne Umbau in Gallensäuren, direkt in die Galle ausgeschieden werden [146]. An der Gallensäuresynthese sind 17 verschiedene Enzyme beteiligt von denen viele überwiegend in der Leber exprimiert werden [145]. Die Reaktionsschritte bis zur Entstehung von Gallensäure aus Cholesterin beinhalten im Allgemeinen a) eine 7 $\alpha$ -Hydroxylierung zur Bildung von Oxysterin, b) weitere Modifikationen der Ringstruktur, c) Oxidation und Kürzung der Seitenkette und d) die Konjugation der Gallensäure mit einer Aminosäure [145]. Die Hydroxylierung des Cholesterins kann an der Ringstruktur oder an drei verschiedenen Positionen der Seitenkette erfolgen, wodurch entweder das 7 $\alpha$ -, das 24-, das 25- oder das 27-Hydroxycholesterin gebildet wird. Diese Oxysterine dienen als Vorläufermoleküle für die Synthese primärer Gallensäureverbindungen [147]. Es gibt somit mehrere Stoffwechselwege der Gallensäuresynthese. Der klassische Weg führt im ersten Reaktionsschritt zu 7 $\alpha$ -Hydroxycholesterin und wird von der mikrosomalen Cholesterin-7 $\alpha$ -Monooxygenase (Cyp7a1) katalysiert. Dieses Enzym wird ausschließlich in der Leber synthetisiert. Der alternative Weg erzeugt extrahepatisch das 27-Hydroxycholesterin durch Hydroxylierung [148]. Diese Reaktion wird von der mitochondrialen Sterol-26-Hydroxylase (Cyp27a1) ermöglicht, welche in nahezu allen Geweben vorkommt. Das 27-Hydroxycholesterin ist das am häufigsten vorkommende Oxysterin im Plasma von Menschen [149] und Mäusen [150]. Zusätzlich können Oxysterine auch durch nicht enzymatische Reaktionen von Cholesterin mit reaktiven Sauerstoffspezies entstehen [151]. Die Oxysterine haben neben den Gallensäuren ebenfalls Einfluss auf den Cholesterinstoffwechsel über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren [152,153]. Für die Exkretion der verschiedenen Cholesterinderivate in den Gallengang sind ABC-Transporter unerlässlich. Der bekannteste Gallensäuretransporter ist ABCB11 [154,155], aber auch ABCB1 [156] kann Gallensäuren sekretieren. Die Transporter ABCC2 und ABCC3 transportieren konjugierte Gallensäuren [154,157] und ABCB4 Phosphatidylcholin [158–160] in den Gallengang. Die direkte Cholesterinsekretion in den Gallengang übernimmt hauptsächlich das Transporterdimer aus ABCG5 und ABCG8 [161–163]. Diese scheiden sowohl Pflanzensterine als auch nicht prozessiertes Cholesterin aus [164,165].

### 2.2.6 Die transkriptionale Regulation der Cholesterinhomöostase

Die Cholesterinbiosynthese wird auf transkriptionaler, post-transkriptionaler Ebene und über Rückkopplungsmechanismen moduliert [166]. Dieser Syntheseweg ist eng mit dem zellulären Cholesterin- und Oxysterin Gehalt gekoppelt und wird durch eine Transkriptionsfaktor-Familie reguliert, den Sterolregulationselementen (SREBP; Genname: *SREBF*) [167], bestehend aus drei Mitgliedern: SREBP1a, SREBP1c und SREBP2 [168,169]. Als inaktive Vorläufer sind diese zunächst membrangebunden, können über eine proteolytische Kaskade aktiviert werden und in den Zellkern zur Regulierung einer Reihe von Zielgenen wandern [170]. Der Transkriptionsfaktor SREBP2 reguliert verstärkt Gene der Cholesterinbiosynthese, während SREBP1c vornehmlich Gene der Fettsäuresynthese koordiniert [171]. Ein zellulärer Mangel an Cholesterin induziert über SREBP2 parallel die Expression der *HMGCR* und des *LDLR*, um mit Hilfe der *de-novo*-Synthese und auch der extrazellulären Cholesterinaufnahme dem Mangel effizient entgegenzuwirken [78]. Eine weitere Gruppe von Transkriptionsfaktoren trägt zur Aufrechterhaltung der Cholesterin-homöostase bei, die nukleären Rezeptoren. Auch diese können durch Oxysterine, Steroide oder Gallensäuren aktiviert werden [152,172–174]. Zu den wichtigsten ligandenaktivierten Transkriptionsfaktoren des Cholesterinstoffwechsels gehört die Gruppe der Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR), die Gruppe der Oxysterin-Rezeptoren LXR (auch Leber-X-Rezeptoren; LXR), wozu auch der Gallensäure-Rezeptor (auch Farnesoid-X-aktivierter Rezeptor FXR; Genname: *NR1H4*) gehört und die Gruppe der Retinsäure-Rezeptoren RXR (RXR) [175]. Es gibt drei gewebespezifische PPARs, PPAR $\alpha$  (Genname: *NR1C1*), PPAR $\beta$  (Genname: *NR1C2*) und PPAR $\gamma$  (Genname: *NR1C3*) [176]. Diese sind erst nach Bildung eines Heterodimers mit anderen Kernrezeptoren aktive Transkriptionsfaktoren [177]. PPAR $\alpha$  ist vor allem in den Lipidkatabolismus und in die Proliferation von Peroxisomen involviert [178]. Der Faktor FXR ist in der Leber ein wesentlicher Regulator der Gallensäure-homöostase [179,180]. Gallensäuren regulieren die eigene Synthese und Metabolisierung über diesen Transkriptionsfaktor, der unter anderem die Expression von *Cyp7a1* und einigen ABC-Transportern wie *ABCB11* und *ABCB4* induziert [181]. Etliche in der Gallensäuresynthese entstandene Oxysterine aktivieren Proteine der Unterfamilie LXR. Die Mitglieder LXR $\alpha$  (Genname: *NR1H3*) und LXR $\beta$  (Genname: *NR1H2*) [182,183] sorgen für die Induktion von Genen des reversen Cholesterintransports [184]. Dazu zählen Gene, die für Apolipoproteine, Lipidtransporter wie *ABCA1* und *ABCG1* bzw. *ABCG5* und *ABCG8*, aber auch für metabolisierende Enzyme wie *LPL* kodieren [185,186]. Die Mitglieder der Transkriptionsfaktorenfamilie RXR haben bezüglich der Cholesterin-homöostase insofern eine regulatorische Aufgabe, als dass diese mit anderen Kernrezeptoren funktionale Heterodimere bilden können [187–189].

## 2.3 Zielsetzung der Arbeit

PXE ist primär durch die progressive Kalzifizierung der elastischen Fasern des Bindegewebes bis hin zur Fragmentierung geprägt. Mutationen im *ABCC6*-Gen sind ursächlich für PXE. Polymorphismen des *ABCC6*-Gens hingegen werden vielfach mit Veränderungen der Cholesterinkonzentration im Blut und einem erhöhten Risiko für Herzerkrankungen in Zusammenhang gebracht. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Untersuchung der Cholesterinhomöostase zu einem frühen und zu einem fortgeschrittenen Stadium von PXE mit Hilfe des *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mausmodells. Das beinhaltete die vergleichende Analyse von 6 Monate und 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit gleichaltrigen (Wt)-Mäusen, um eine Alteration der Serumlipide und deren mögliche Ursachen in Folge einer *Abcc6*-Defizienz zu analysieren.

Im ersten Teil der Arbeit lag der Schwerpunkt auf der Analyse der Serumlipide. Dafür sollten die Serumkonzentrationen des Gesamtcholesterins, des HDL-, des LDL/VLDL- sowie des oxidierten LDL-Cholesterins der 6 Monate und 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse und Wt-Mäuse bestimmt werden. Zusätzlich sollte der Gehalt von Phytosterinen wie Brassicasterin, Campesterin, Sitosterin und Stigmasterin in den Mausseren quantifiziert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten Veränderungen des Cholesterin- und Lipoprotein-stoffwechsels bei einer *Abcc6*-Defizienz untersucht werden. Hierfür sollte zunächst eine breitgefächerte Expressionsanalyse von 84 Genen des Cholesterin- und Lipoprotein-stoffwechsels durchgeführt werden. Für die Analyse sollten Proben metabolisch aktiver Gewebe, wie des Leber-, des Nieren- und des weißen Fettgewebes, von 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen und Wt-Mäusen eingesetzt werden. Außerdem sollten die Genexpressionsraten von Schlüsselenzymen der Cholesterinbiosynthese im Lebergewebe von 6 Monate und 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit den gleichaltrigen Wt-Mäusen verglichen werden. Ein weiterer Schwerpunkt lag in der Expressionsanalyse von Apolipoproteinen auf Transkriptions- und Proteinebene. Außerdem sollten im Serum die Lcat-Aktivität, die Pcsk9-Konzentration sowie im Lebergewebe die Expressionsrate der cholesterinabbauenden Enzyme *Cyp7a1* und *Cyp27a1* von 6 Monate und 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen und Wt-Mäusen ermittelt werden.

Die ABC-Transporter übernehmen in wichtigen physiologischen Prozessen eine herausragende Rolle, sodass eine beeinträchtigte oder fehlende Funktion dieser Proteine teilweise durch andere ABC-Transporter kompensiert wird. In einem weiteren Teil dieser Arbeit sollten daher die relativen Genexpressionsraten ausgewählter ABC-Transporter des Lipidstoffwechsels im Leber-, im Nieren- und im weißen Fettgewebe von 6 Monate und 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit den Wt-Mäusen verglichen werden.

### 3 Ergebnisse

Für die Cholesterinhomöostase eines Organismus spielt die Leber eine entscheidende Rolle. Es gibt bezüglich dieser Organfunktion mehrere Mechanismen die Homöostase aufrechtzuerhalten, wie die *de-novo*-Cholesterinbiosynthese, die rezeptorvermittelte Aufnahme cholesterinreicher Partikel, die Cholesterinspeicherung oder der Cholesterinabbau in Gallensäuren [167]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Veränderungen des Cholesterinstoffwechsels bei einem Funktionsverlust von Abcc6 im Mausmodell untersucht. Die Analysen umfassten Mäuse mit einem *Abcc6-Knockout* (*Abcc6*<sup>-/-</sup>) und einem unveränderten Genotyp (Wt). Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Präparation 6 Monate ± 2 Wochen und 12 Monate ± 4 Wochen alt. Diese zwei Altersklassen an untersuchten Mäusen entsprechen im humanen Modell PXE-Patienten zu einem frühen und zu einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium.

Die Untersuchungen des Serums in Bezug auf die Cholesterinhomöostase bei einer Abcc6-Defizienz wurden an nicht gefasteten Tieren durchgeführt, da die Gesellschaft für Versuchstierkunde und die tierärztliche Vereinigung für Tierschutz grundsätzlich für Blutentnahmen bei Nagetieren keine Nahrungskarenz empfehlen [190]. Auch die Gesellschaft der toxikologischen Pathologie hält in ihren Leitlinien zur Untersuchung diverser hämatologischer Analyten ein Fasten erst für größere Nagetiere, wie Ratten, als angemessen [191]. Zudem konnte in Langzeitstudien am Menschen gezeigt werden, dass die Messung von Serumlipiden auch ohne Nahrungskarenz zuverlässige Ergebnisse zur Beurteilung des metabolischen Zustandes und kardiovaskulärer Risiken liefert [192–195]. Die Deutsche Gesellschaft für Kardiologie beschreibt in den Leitlinien zur Diagnostik und Therapie der Dyslipidämien, dass analysierte Lipid- und Apolipoprotein-Laborwerte eines nicht nüchternen Patienten eine ähnliche Vorhersagekraft zur Bewertung des kardiovaskulären Risikos besitzen wie unter Nahrungskarenz [196]. Die Haltungsbedingungen der Mäuse umfassten eine Standarddiät (V1536-000, Extrudat der Firma sniff Spezialdiäten GmbH, Soest), deren umsetzbare Energie sich zu 67 % aus Kohlenhydraten, zu 23 % aus Proteinen und zu 10 % aus Fetten zusammensetzte. Der Fokus dieser Arbeit bestand in der Analyse der Auswirkungen einer Abcc6-Defizienz auf den natürlichen Cholesterinmetabolismus der Maus.

Zur ersten Analyse des metabolischen Phänotyps Abcc6-defizienter Mäuse wurde nach der zervikalen Dislokation der Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse das Körpergewicht und das Gewicht der Leber ermittelt. Die Tabelle 1 bildet die Daten zum Körpergewicht und zum relativen Lebergewicht im Verhältnis zum Körpergewicht ab, die bei der Organentnahme erfasst wurden.

**Tabelle 1: Körpergewicht ( $g \pm SEM$ ) und relatives Lebergewicht im Verhältnis zum Körpergewicht ( $\% \pm SEM$ ) 6 Monate sowie 12 Monate alter Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse. Die statistischen Signifikanzen wurden mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test berechnet.**

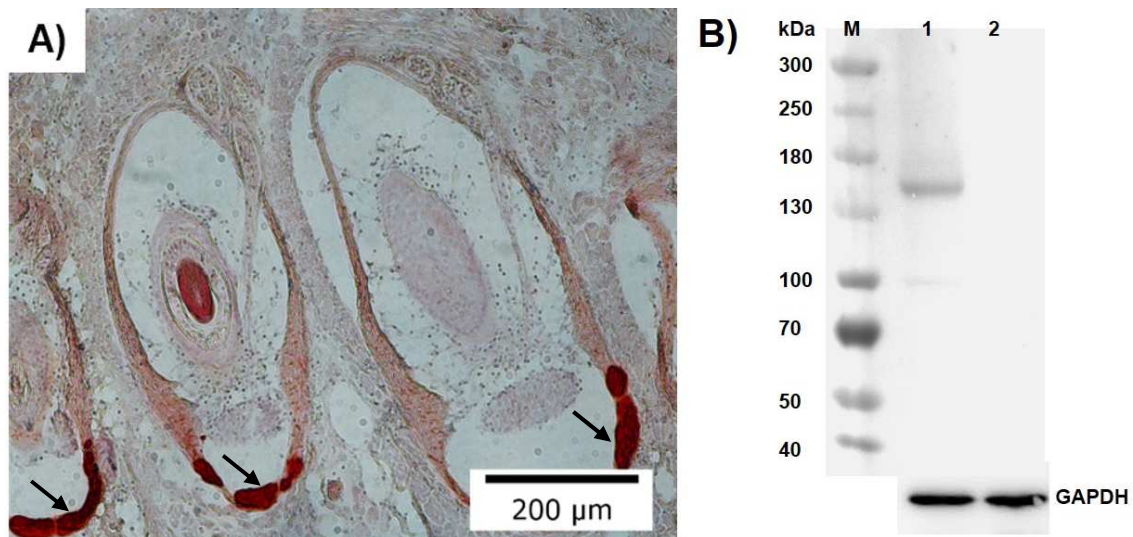
	6 Monate alte Mäuse			12 Monate alte Mäuse		
	Wt (n=28)	<i>Abcc6</i> <sup>-/-</sup> (n=24)	p-Wert	Wt (n=47)	<i>Abcc6</i> <sup>-/-</sup> (n=50)	p-Wert
<b>Körpergewicht [g]</b>	28,28 $\pm 0,73$	27,75 $\pm 0,76$	0,7272	31,14 $\pm 0,56$	30,48 $\pm 0,55$	0,3251
<b>Relatives Lebergewicht [%]</b>	4,98 $\pm 0,11$	4,94 $\pm 0,17$	0,8532	5,04 $\pm 0,10$	4,54 $\pm 0,09$	0,0002***

Es wurde kein signifikanter Unterschied im Körpergewicht zwischen Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen in beiden untersuchten Altersgruppen festgestellt. Das prozentuale Lebergewicht bezogen auf das Körpergewicht unterschied sich ebenfalls nicht signifikant zwischen den 6 Monate alten Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Tab. 1). Allerdings war das prozentuale Lebergewicht der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den Wt-Mäusen signifikant reduziert (s. Tab. 1).

### 3.1 Kalzifizierung der Vibrissenkapseln bei einer *Abcc6*-Defizienz

Als früher Biomarker eines *Abcc6-Knockouts* dienen die Mineralisierungen der Vibrissenkapseln, da die Bindegewebsstrukturen dieser Kapseln ab der 6. Lebenswoche durchweg in den *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen kalzifizieren und die Mineralisierung mit dem Alter der Mäuse zunehmen [197]. Zur Verifizierung des *Abcc6*-Funktionsverlustes in den transgenen Mäusen wurden zum einen die Vibrissenkapseln zum Nachweis von Kalzifizierungen mit einer Alizarin-Rot-Lösung gefärbt und lichtmikroskopisch analysiert. Zum anderen wurde mittels *Western-Blot*-Verfahren das *Abcc6*-Protein im Homogenat des Lebergewebes von *Abcc6*<sup>-/-</sup>- und Wt-Mäuse untersucht (s. Abb. 7A und 7B).

Die exemplarische lichtmikroskopische Aufnahme (s. Abb. 7A) eines Gefrierschnittes der Vibrissen einer *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Maus weist eine rote Färbung entlang des äußeren Randes der Vibrissenkapseln auf. Die Abbildung 7B zeigt die Aufnahme der *Western-Blot*-Membran der Leberhomogenate einer 12 Monate alten Wt- und einer *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Maus nach Inkubation mit dem *Abcc6*-Antikörper *Clone M6II-24*. Für das Leberhomogenat der Wt-Maus wurde eine Proteinbande bei ca. 165 kDa und für die Leberprobe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Maus wurde keine Bande detektiert (s. Abb. 7B).

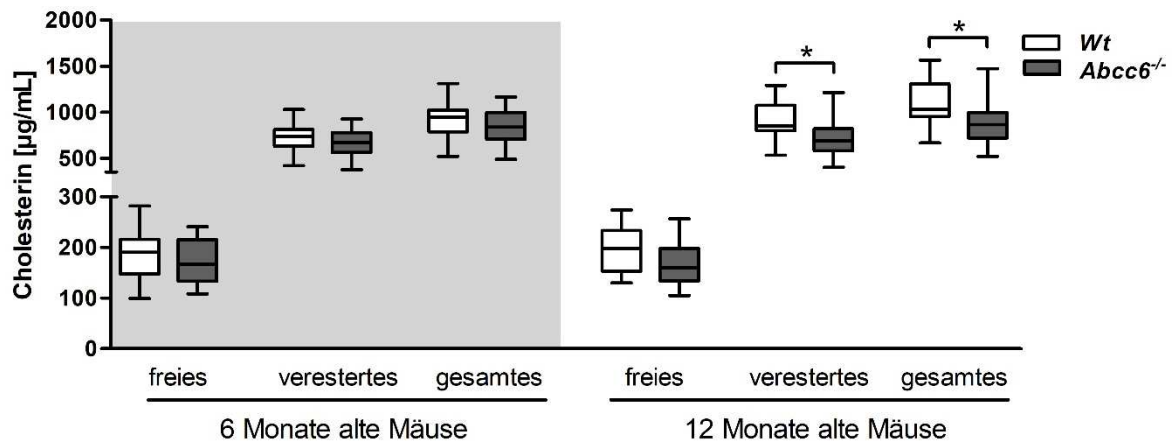


**Abbildung 7: Alizarin-Rot-Färbung der Vibrissenkapseln einer 12 Monate alten *Abcc6*-defizienten Maus und die Western-Blot-Analyse der *Abcc6*-Proteinexpression im Lebergewebe.** A) Exemplarische Aufnahme einer Alizarin-Rot-Färbung eines 5 µm dicken Gefrierschnitts der Vibrissenkapseln mit Kalzifizierungen (Pfeile) einer 12 Monate alten *Abcc6*-defizienten Maus bei einer 100-fachen Vergrößerung. B) Exemplarische Western-Blot-Membran zum Nachweis des *Abcc6*-Proteins einer 12 Monate alten Wt- und einer *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Maus. Es wurden pro Probe 40 µg Gesamtprotein aufgetragen. M: *Spectra Multicolor High Range Protein Ladder*; 1: Leberhomogenat einer Wt-Maus; 2: Leberhomogenat einer *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Maus.

## 3.2 Veränderungen der Serumlipide bei einer *Abcc6*-Defizienz

### 3.2.1 Reduzierter Cholesteringehalt im Serum der *Abcc6*-defizienten Mäuse

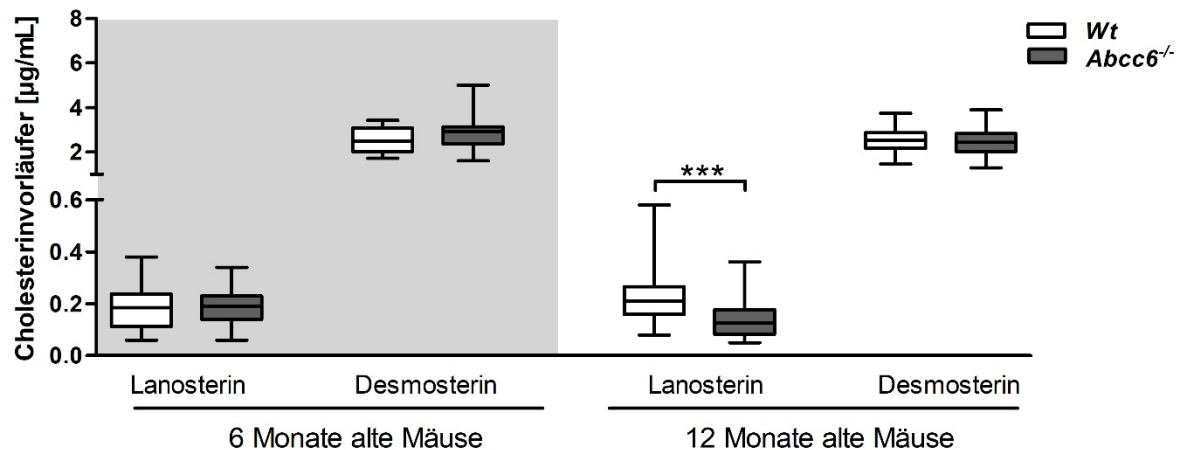
Um den Einfluss des *Abcc6*-Transporters auf den Cholesterinstatus zu untersuchen, wurde die Konzentration von Cholesterin sowie dessen Vorläufermoleküle Lanosterin und Desmosterin, im Serum von 6 Monate und 12 Monate alten Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen massenspektrometrisch quantifiziert. Es wurde dabei zwischen freiem und verestertem Cholesterin unterschieden. Mit Hilfe eines kommerziellen Testsystems wurde zusätzlich analysiert, ob das HDL- oder das LDL/VLDL-Cholesterin von einer Konzentrationsveränderung betroffen war. Auch hierfür wurden die Serumproben von 6 Monate und 12 Monate alten Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen verwendet. Zudem wurde noch die Konzentration des oxidierten LDL-Cholesterins (oxLDL) *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)-basiert im Serum beider Altersgruppen untersucht. Die Abbildung 8 zeigt den unterschiedlichen Cholesteringehalt im Serum von 6 Monate und 12 Monate alten Wt- und *Abcc6*-defizienten Mäusen. Das Serum der 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse wies im Vergleich zum Serum der Wt-Mäuse eine geringere Konzentration an freiem, verestertem und an Gesamtcholesterin auf. Die Reduktionen in dieser Altersgruppe waren jedoch statistisch nicht signifikant (s. Abb. 8).



**Abbildung 8: Quantifizierung der Konzentration des freien, des veresterten und des gesamten Cholesterins im Serum 6 Monate und 12 Monate alter Mäuse.** Die Konzentration von freiem, verestertem und dem Gesamtcholesterin wurde mittels Massenspektrometrie im Serum von 6 Monate und 12 Monate alten Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen quantifiziert (6 Monate alte Mäuse: Wt n=28, *Abcc6*<sup>-/-</sup> n=19; 12 Monate alte Mäuse: Wt n=41, *Abcc6*<sup>-/-</sup> n=40). Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Die statistischen Signifikanzen wurden mit der einfaktoriellen Varianzanalyse berechnet (\* = p ≤ 0,05).

Das freie Cholesterin war im Serum der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse verglichen mit den Wt-Mäusen vermindert, wobei diese Minderung jedoch statistisch nicht signifikant war (s. Abb. 8). Es wurde eine statistisch signifikante Abnahme der veresterten Cholesterinkonzentration (Wt 904,50 ± 28,12 µg/mL vs. *Abcc6*<sup>-/-</sup> 715,50 ± 30,45 µg/mL) im Serum der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse in Bezug auf die Wt-Mäuse festgestellt. Ebenso konnte eine statistisch signifikante Verminderung der gesamten Cholesterinkonzentration (Wt 1100,00 ± 32,41 µg/mL vs. *Abcc6*<sup>-/-</sup> 881,20 ± 35,55 µg/mL) im Serum der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse detektiert werden (s. Abb. 8).

Für die Cholesterinvorläufer Lanosterin und Desmosterin konnte keine signifikante Konzentrationsänderung im Serum der 6 Monate alten *Abcc6*-Knockout-Mäuse im Vergleich zu den Wt-Mäusen beobachtet werden. Allerdings lag das Lanosterin signifikant reduziert im Serum der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse verglichen mit den Wt-Mäusen vor (Wt 0,23 ± 0,02 µg/mL vs. *Abcc6*<sup>-/-</sup> 0,14 ± 0,01 µg/mL; s. Abb. 9). Die Desmosterinkonzentration des Serums der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse unterschied sich nicht von der Desmosterinkonzentration im Serum der gleichaltrigen Wt-Mäuse (s. Abb. 9).



**Abbildung 9: Konzentrationsbestimmung der Cholesterinvorläufer Lanosterin und Desmosterin im Serum 6 Monate und 12 Monate alter Mäuse.** Die Serumkonzentrationen der Cholesterinvorläufer Lanosterin und Desmosterin wurden mittels Massenspektrometrie für 6 Monate und 12 Monate alte Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse quantifiziert (6 Monate alte Mäuse: Wt n = 28, *Abcc6*<sup>-/-</sup> n = 19; 12 Monate alte Mäuse: Wt n = 41, *Abcc6*<sup>-/-</sup> n = 40). Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Die statistischen Signifikanzen wurden mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test berechnet (\*\*\*) =  $p \leq 0,001$ ).

Sowohl die absoluten Serumkonzentrationen an Cholesterinvorläufermolekülen, als auch deren Verhältnis bezogen auf die totale Cholesterinkonzentration werden zur Aktivitätsbestimmung der Cholesterinbiosynthese genutzt [198]. Das Verhältnis der Serumkonzentration von Lanosterin oder Desmosterin zum Gesamtcholesteringehalt korreliert stark mit der hepatischen HMGCR-Aktivität [199]. Die Tabelle 2 zeigt die Verhältnisse der Serumkonzentration dieser Cholesterinvorläufer zum Gesamtcholesterin der 6 Monate und 12 Monate alten Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse.

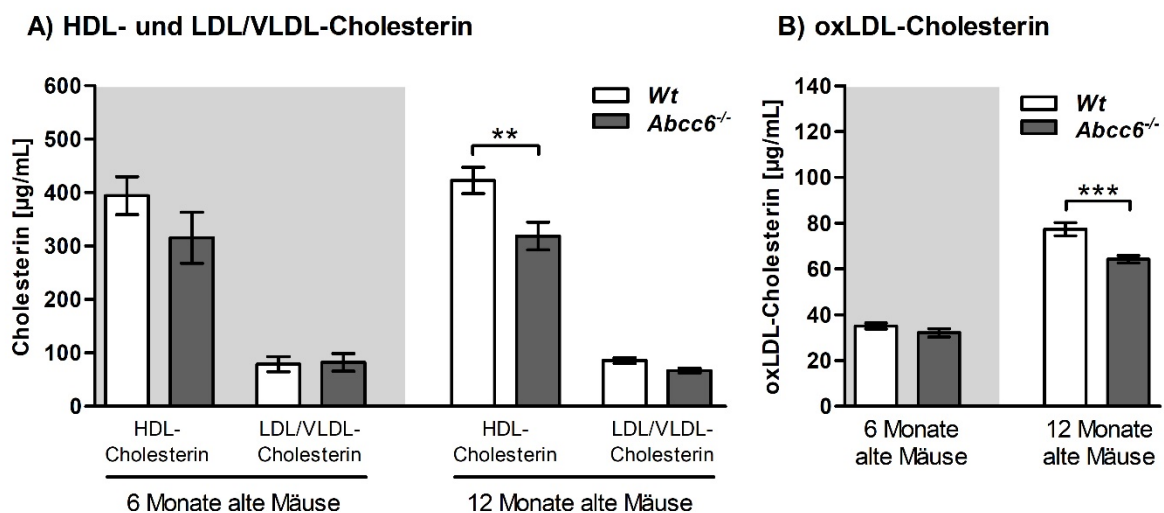
**Tabelle 2: Verhältnis der Konzentration von Cholesterinvorläufern zur totalen Cholesterinkonzentration ( $\mu\text{g}/\text{mg} \pm \text{SEM}$ ) im Serum 6 Monate sowie 12 Monate alter Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse. Die statistischen Signifikanzen wurden mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test berechnet.**

Verhältnis [ $\mu\text{g}/\text{mg}$ ]	6 Monate alte Mäuse			12 Monate alte Mäuse		
	Wt (n=28)	<i>Abcc6</i> <sup>-/-</sup> (n=19)	p-Wert	Wt (n=41)	<i>Abcc6</i> <sup>-/-</sup> (n=40)	p-Wert
<b>Lanosterin<sub>total</sub> zu Cholesterin<sub>total</sub></b>	0,21 $\pm 0,02$	0,24 $\pm 0,02$	0,2326	0,21 $\pm 0,02$	0,16 $\pm 0,01$	0,0048**
<b>Desmosterin<sub>total</sub> zu Cholesterin<sub>total</sub></b>	2,76 $\pm 0,07$	3,46 $\pm 0,17$	0,0001***	2,34 $\pm 0,07$	2,86 $\pm 0,15$	0,0003***



Es wurde keine signifikante Veränderung des Verhältnisses der Lanosterin- zur Cholesterinkonzentration für die 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den Wt-Mäusen ermittelt (s. Tab. 2). Im Gegensatz dazu war das Verhältnis des Lanosterin- gehaltes zum Cholesteringehalt signifikant im Serum der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse verglichen mit den Wt-Mäusen erniedrigt. Das Verhältnis der Desmosterin- zur Cholesterinkonzentration im Serum der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse beider Altersgruppen war signifikant höher als für die entsprechenden Wt-Mäuse (s. Tab. 2).

Aufgrund der erniedrigten Cholesterinkonzentration im Serum der *Abcc6*-defizienten Mäuse wurde zusätzlich untersucht, welche Cholesterinfraktion, die HDL- oder die LDL/VLDL-Partikel, von der Veränderung betroffen war (s. Abb. 10A). Darüber hinaus wurde der Gehalt von oxLDL-Cholesterin im Serum der 6 Monate und 12 Monate alte Mäuse bestimmt (s. Abb. 10B). In der HDL-Fraktion der 6 Monate alten *Abcc6*-defizienten Mäuse wurde in Bezug auf die gleichaltrigen Wt-Mäuse weniger Cholesterin detektiert (s. Abb. 10A), wobei diese Reduktion statistisch nicht signifikant war. Die Bestimmung des LDL- sowie des oxLDL-Cholesterins im Serum der 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse war nahezu identisch mit der LDL- und oxLDL-Cholesterinbestimmung im Serum der 6 Monate alten Wt-Mäuse (s. Abb. 10A und 10B).



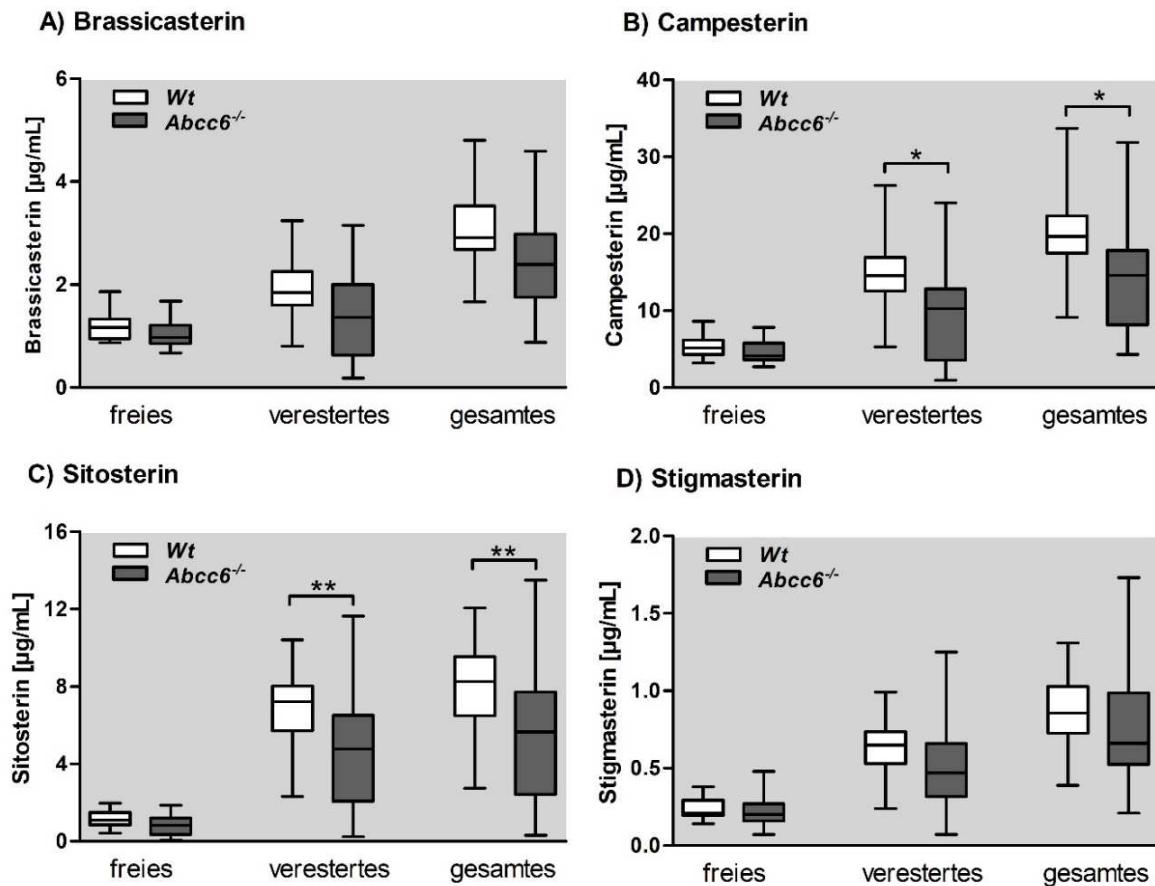
**Abbildung 10: Bestimmung der Cholesterinkonzentration der HDL- und LDL/VLDL-Partikel sowie Quantifizierung des oxidierten LDL-Cholesterins im Serum 6 Monate und 12 Monate alter Mäuse.** A) Die HDL- und LDL/VLDL-Cholesterinkonzentration wurde im Serum von 6 Monate und 12 Monate alten Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen bestimmt (6 Monate alte Mäuse: Wt n = 8, *Abcc6*<sup>-/-</sup> n = 4; 12 Monate alte Mäuse: Wt n = 18, *Abcc6*<sup>-/-</sup> n = 17). B) Die Konzentration oxidierten LDL (oxLDL)-Partikel wurde im Serum von 6 Monate sowie 12 Monate alten Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen (6 Monate alte Mäuse: Wt n = 23, *Abcc6*<sup>-/-</sup> n = 17; 12 Monate alte Mäuse: Wt n = 29, *Abcc6*<sup>-/-</sup> n = 29) mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte einer Doppelbestimmung und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Die statistischen Signifikanzen wurden mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (A) oder mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test (B) berechnet (\*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ).

Eine stärkere und signifikante Reduktion der HDL-Cholesterinkonzentration wurde im Serum der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse detektiert (Wt  $422,90 \pm 24,37 \mu\text{g/mL}$  vs. *Abcc6*<sup>-/-</sup>  $318,90 \pm 26,06 \mu\text{g/mL}$ ; s. Abb. 10A). Die Daten zeigten auch eine Cholesterinabnahme in der LDL-Fraktion der älteren *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse. Diese Reduktion war jedoch statistisch nicht signifikant (s. Abb. 10A). Es wurde zudem eine signifikante Konzentrationsabnahme des oxLDL-Cholesterins im Serum der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse in Bezug auf die Wt-Mäuse nachgewiesen (Wt  $77,37 \pm 2,85 \mu\text{g/mL}$  vs. *Abcc6*<sup>-/-</sup>  $64,18 \pm 1,64 \mu\text{g/mL}$ ; s. Abb. 10B).

### 3.2.2 Erniedrigte Konzentration pflanzlicher Sterine im Serum der *Abcc6*-defizienten Mäuse

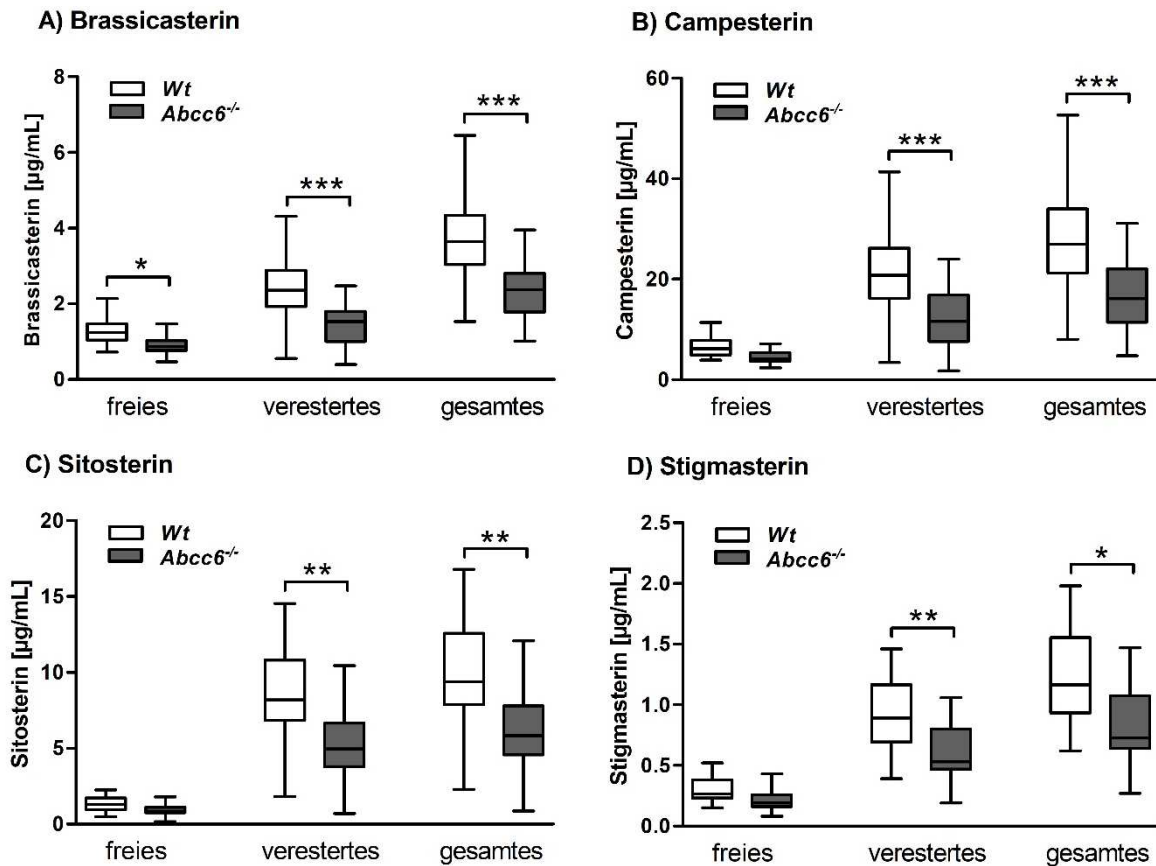
Die Serumkonzentration der Phytosterine, wie Campesterin und Sitosterin, korreliert positiv mit der Absorption von Cholesterin aus der Nahrung und dem HDL-Cholesteringehalt [198]. Aus diesem Grund wurde die Konzentration der Pflanzensterine Brassicasterin, Campesterin, Sitosterin und Stigmasterin im Serum von 6 Monate und 12 Monate alten Wt- und *Abcc6*-defizienten Mäusen mittels Massenspektrometrie quantifiziert (s. Abb. 11 und 12). Die Abbildung 11 zeigt die Konzentration der freien, der veresterten sowie die Gesamtkonzentration der Phytosterine im Serum 6 Monate alter Mäuse und die Abbildung 12 die Konzentration der Pflanzensterine im Serum der 12 Monate alten Mäuse. Insgesamt wurden niedrigere Konzentrationen aller Phytosterine im Serum der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse beider Altersgruppen im Vergleich zu den entsprechenden Wt-Mäusen bestimmt (s. Abb. 11 und 12).

Der Serumgehalt an freiem, verestertem und dem Gesamtbrassicasterin sowie an freiem, verestertem und dem Gesamtstigmasterin war in den 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse verglichen mit den gleichaltrigen Wt-Mäusen erniedrigt. Diese Reduktionen waren jedoch statistisch nicht signifikant (s. Abb. 11A und 11D). Allerdings wurde eine signifikante Konzentrationsminderung des veresterten Campesterins (Wt  $15,17 \pm 0,89 \mu\text{g/mL}$  vs. *Abcc6*<sup>-/-</sup>  $10,33 \pm 1,62 \mu\text{g/mL}$ ) sowie des totalen Campesterins (Wt  $20,51 \pm 1,09 \mu\text{g/mL}$  vs. *Abcc6*<sup>-/-</sup>  $14,89 \pm 1,90 \mu\text{g/mL}$ ) im Serum der 6 Monate alten *Abcc6*-defizienten Mäuse im Verhältnis zu den Wt-Mäusen beobachtet. Die Konzentration des freien Campesterins lag im Serum der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse allerdings nicht signifikant erniedrigt vor (s. Abb. 11B).



**Abbildung 11: Quantifizierung der Phytosterinkonzentrationen im Serum 6 Monate alter Mäuse.** Die Konzentrationen der freien, veresterten und der gesamten Phytosterine A) Brassicasterin B) Campesterin C) Sitosterin und D) Stigmasterin wurden massenspektrometrisch im Serum von 6 Monate alten Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen quantifiziert (Wt n = 28, *Abcc6*<sup>-/-</sup> n = 19). Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Die statistischen Signifikanzen wurden mit der einfaktoriellen Varianzanalyse berechnet (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ).

Die Konzentration des veresterten (Wt  $6,94 \pm 0,35 \mu\text{g/mL}$  vs. *Abcc6*<sup>-/-</sup>  $4,86 \pm 0,78 \mu\text{g/mL}$ ) und des gesamten Sitosterins (Wt  $8,07 \pm 0,41 \mu\text{g/mL}$  vs. *Abcc6*<sup>-/-</sup>  $5,74 \pm 0,91 \mu\text{g/mL}$ ) im Serum der 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse war im Vergleich zu den Wt-Mäusen signifikant vermindert. Der Gehalt an freiem Sitosterin im Serum der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse war zwar ebenfalls reduziert, jedoch statistisch nicht signifikant (s. Abb. 11C). Es wurde eine signifikante Reduktion der freien Brassicasterinkonzentration (Wt  $2,42 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$  vs. *Abcc6*<sup>-/-</sup>  $1,43 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$ ), der veresterten Brassicasterinkonzentration (Wt  $1,28 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$  vs. *Abcc6*<sup>-/-</sup>  $0,90 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ ) und der gesamten Brassicasterinkonzentration (Wt  $3,71 \pm 0,16 \mu\text{g/mL}$  vs. *Abcc6*<sup>-/-</sup>  $2,33 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$ ) im Serum der 12 Monate alten *Abcc6*-defizienten Mäuse vergleichend zu den Wt-Mäusen ermittelt (s. Abb. 12A).



**Abbildung 12: Quantifizierung der Phytosterinkonzentrationen im Serum 12 Monate alter Mäuse.** Die Konzentrationen der freien, veresterten und der gesamten Phytosterine A) Brassicasterin B) Campesterin C) Sitosterin und D) Stigmasterin wurden massenspektrometrisch im Serum von 12 Monate alten Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen quantifiziert (Wt n = 41, *Abcc6*<sup>-/-</sup> n = 40). Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Die statistischen Signifikanzen wurden mit der einfaktoriellen Varianzanalyse berechnet (\* = p ≤ 0,05; \*\* = p ≤ 0,01; \*\*\* = p ≤ 0,001).

Ebenso wurden eine signifikante Konzentrationserniedrigung des veresterten Campesterins (Wt  $21,37 \pm 1,19 \mu\text{g/mL}$  vs. *Abcc6*<sup>-/-</sup>  $11,81 \pm 0,93 \mu\text{g/mL}$ ) sowie eine nicht signifikante Abnahme des freien Campesterins im Serum der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse in Bezug zu den Wt-Mäusen beobachtet. Die Konzentration des totalen Campesterins sank somit signifikant um  $11,5 \pm 2,6 \mu\text{g/mL}$  im Serum der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse (Wt  $27,88 \pm 1,45 \mu\text{g/mL}$  vs. *Abcc6*<sup>-/-</sup>  $16,35 \pm 1,10 \mu\text{g/mL}$ ; s. Abb. 12B). Die Konzentration des veresterten Sitosterins (Wt  $8,56 \pm 0,45 \mu\text{g/mL}$  vs. *Abcc6*<sup>-/-</sup>  $5,11 \pm 0,39 \mu\text{g/mL}$ ) und des Gesamtsitosterins (Wt  $9,89 \pm 0,51 \mu\text{g/mL}$  vs. *Abcc6*<sup>-/-</sup>  $6,00 \pm 0,46 \mu\text{g/mL}$ ) war im Serum der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den Wt-Mäusen signifikant reduziert. Der freie Sitosteringehalt des Serums der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse war gegenüber der freien Sitosterinkonzentration im Serum der Wt-Mäuse nicht signifikant vermindert (s. Abb. 12C). Die Serumkonzentration an freiem Stigmasterin war in den 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse verglichen mit den Wt-Mäusen ebenfalls reduziert, wobei

diese Reduktion ebenfalls statistisch nicht signifikant war. Die Konzentrationsabnahme des veresterten Stigmasterins (Wt  $0,91 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$  vs. *Abcc6*<sup>-/-</sup>  $0,61 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$ ) und des Gesamtstigmasterins (Wt  $1,22 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$  vs. *Abcc6*<sup>-/-</sup>  $0,83 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$ ) war im Serum der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse in Bezug auf die gleichaltrigen Wt-Mäuse statistisch signifikant (s. Abb. 12D).

Das Verhältnis von einer Phytosterinkonzentration zur totalen Cholesterinkonzentration im Serum kann sowohl die Effektivität der Cholesterinabsorption, als auch die Aktivität der Cholesterinbiosynthese reflektieren [198,200–202]. Die Tabelle 3 zeigt die Verhältnisse der Serumkonzentration von Phytosterinen zum Gesamtcholesterin der 6 Monate und 12 Monate alten Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse. Zusammengefasst war das Verhältnis der pflanzlichen Sterine Brassicasterin, Campesterin, Sitosterin und Stigmasterin zum totalen Cholesterin im Serum aller *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse geringer als in den Wt-Mäusen. Eine signifikante Erniedrigung des Verhältnisses der Campesterin- zur Gesamtcholesterinkonzentration lag sowohl im Serum der 6 Monate (um 4,2), als auch im Serum der 12 Monate (um 5,9) alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse vor (s. Tab. 3). Das Verhältnis des Brassicasteringehaltes, des Sitosteringehaltes und des Stigmasteringehaltes zur Gesamtcholesterinkonzentration war für die 6 Monate alten Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse statistisch nicht signifikant verschieden. Im Serum der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse allerdings war das Verhältnis der Phytosterinkonzentration von Brassicasterin (um 0,6), von Sitosterin (um 1,9) und von Stigmasterin (um 0,2) zum Gesamtcholesteringehalt im Vergleich zu den gleichaltrigen Wt-Mäusen statistisch signifikant reduziert (s. Tab. 3).

**Tabelle 3: Verhältnis der Konzentration von Phytosterinen zur totalen Cholesterinkonzentration ( $\mu\text{g/mg} \pm \text{SEM}$ ) im Serum von 6 Monate sowie von 12 Monate alten Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die statistischen Signifikanzen wurden mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test berechnet.**

Verhältnis [ $\mu\text{g/mg}$ ]	6 Monate alte Mäuse			12 Monate alte Mäuse		
	Wt (n=28)	<i>Abcc6</i> <sup>-/-</sup> (n=19)	p-Wert	Wt (n=41)	<i>Abcc6</i> <sup>-/-</sup> (n=40)	p-Wert
<b>Brassicasterin<sub>total</sub> zu Cholesterin<sub>total</sub></b>	3,48 $\pm 0,14$	3,14 $\pm 0,34$	0,2998	3,36 $\pm 0,10$	2,77 $\pm 0,15$	0,0011**
<b>Campesterin<sub>total</sub> zu Cholesterin<sub>total</sub></b>	22,58 $\pm 0,89$	18,42 $\pm 2,14$	0,0499*	25,09 $\pm 0,93$	19,18 $\pm 1,20$	0,0003***
<b>Sitosterin<sub>total</sub> zu Cholesterin<sub>total</sub></b>	8,84 $\pm 0,32$	6,97 $\pm 0,97$	0,1087	8,89 $\pm 0,33$	6,99 $\pm 0,47$	0,0017**
<b>Stigmasterin<sub>total</sub> zu Cholesterin<sub>total</sub></b>	0,95 $\pm 0,03$	0,94 $\pm 0,10$	0,8344	1,11 $\pm 0,05$	0,96 $\pm 0,05$	0,0383*

### 3.3 Auswirkungen einer *Abcc6*-Defizienz auf den Lipoprotein-stoffwechsel und die Cholesterinbiosynthese

#### 3.3.1 Analyse von Genexpressionsprofilen mittels *RT<sup>2</sup> Profiler-PCR-Array*

Um einen Überblick zu erhalten, welche Signalwege des Lipidstoffwechsels bei einem *Abcc6-Knockout* von Veränderungen betroffen sein könnten, wurden mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR)-Array-Analyse die Expressionsveränderungen von 84 Genen des Lipoproteinsignal- und des Cholesterinstoffwechsels in den metabolisch aktiven Geweben: Leber, Niere und weißes Fettgewebe, von 12 Monate alten Wt- und *Abcc6*-defizienten Mäusen untersucht. Die Gene, deren Expressionsrate im Gewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse in der PCR-Array-Analyse  $\geq 2$ -fach oder  $\leq 0,5$ -fach im Vergleich zu den Wt-Mäusen reguliert waren, sind in den Tabelle 4, 5 und 6 zusammengefasst. Die vollständigen Übersichten der Ergebnisse inklusive der C<sub>T</sub>-Werte befinden sich im Anhang (s. Anhang 12.1).

#### 3.3.2 Expressionsveränderungen von Genen des Lipoproteinsignal- und des Cholesterinstoffwechsels im Lebergewebe

Im Lebergewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurde für die mRNA-Expression des Gens Ankyrin-Wiederholungsprotein 2, Familie A (*Ank2*) eine 29-fache Steigerung im Vergleich zu den Wt-Mäusen beobachtet (s. Tab. 4). Die relative Expression des *Low-density lipoproteins* Rezeptor-bezogenen Proteins (*Lrp1*) war 2-fach höher in den *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen als in den Wt-Mäusen. Die Expressionsrate von Apolipoprotein L8 (*ApoL8*) war ebenfalls 2-fach hochreguliert in den *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Im Gegensatz dazu wurde für die Expression des Apolipoprotein D (*ApoD*; 0,04-fach) eine deutliche Erniedrigung festgestellt. Die Expressionsraten der Gene Carboxylesterlipase (*Cel*; 0,09-fach) und Chymotrypsin-ähnliche Elastasefamilie, Mitglied 3B (*Cela3b*; 0,13-fach) zeigten im Lebergewebe der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den Wt-Mäusen ebenfalls eine Abnahme. Die relative Genexpression des Sortilin-bezogenen Rezeptors 1 (*Sor1*) lag im Gewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse um 0,48-fach reduziert vor (s. Tab. 4).

**Tabelle 4: Ergebnisse des RT<sup>2</sup> Profiler-PCR-Arrays vom Lebergewebe: Lipoproteinsignal- und Cholesterinstoffwechsel.**

Gen Protein	<i>Abcc6</i> <sup>-/-</sup> /Wt Fold-Change <sup>1</sup>	Kommentar <sup>2</sup>
<b>Ankra2</b> Ankyrin-Wiederholungsprotein 2, Familie A	↑ 28,77	A
<b>Apod</b> Apolipoprotein D	↓ 0,04	A
<b>Apol8</b> Apolipoprotein L8	↑ 2,21	B
<b>Cel</b> Carboxylesterlipase	↓ 0,09	B
<b>Cela3b</b> Chymotrypsin-ähnliche Elastasefamilie, Mitglied 3B	↓ 0,13	B
<b>Lrp10</b> Low-density lipoprotein Rezeptor-bezogenes Protein 10	↑ 2,02	*
<b>Sorl1</b> Sortilin-bezogener Rezeptor 1	↓ 0,48	B

1: Der Expressionsunterschied (*Fold-Change*) ( $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ ) ist die normalisierte Genexpressionsrate ( $2^{(-\Delta C_T)}$ ) der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Probe geteilt durch die normalisierte Genexpressionsrate ( $2^{(-\Delta C_T)}$ ) der Wt-Probe.

2: \*: Der gemittelte C<sub>T</sub>-Wert liegt in beiden Proben (Wt oder *Abcc6*<sup>-/-</sup>) unter 30.

A: Der gemittelte C<sub>T</sub>-Wert ist hoch (> 30) in einer der Proben (Wt oder *Abcc6*<sup>-/-</sup>) und verhältnismäßig gering in der anderen Probe (< 30).

B: Der gemittelte C<sub>T</sub>-Wert ist hoch (> 30) in beiden Proben (Wt oder *Abcc6*<sup>-/-</sup>) und das relative Expressionslevel ist in beiden Proben gering.

C: Der gemittelte C<sub>T</sub>-Wert ist entweder nicht bestimmbar oder höher als der *Cut-Off*-Wert (C<sub>T</sub>-Wert 35) in beiden Proben (Wt oder *Abcc6*<sup>-/-</sup>) und eine Expression somit nicht detektierbar war.

### 3.3.3 Expressionsveränderungen von Genen des Lipoproteinsignal- und des Cholesterinstoffwechsels im Nierengewebe

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Lebergewebes kam es auch im Nierengewebe der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse zu einem Rückgang der relativen mRNA-Expression von *Apod* (0,35-fach), *Cel* (0,16) und *Cela3b* (0,39-fach) bezogen auf die Wt-Mäuse (s. Tab. 5). Im Gegensatz dazu war die relative Genexpression des Apolipoproteins A-I (*Apoa1*) im Nierengewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse 2-fach erhöht, genau wie die Expression des C-reaktiven Proteins (*Crp*). Eine 10-fache Expressionssteigerung wurde für die Cholesterin-7 $\alpha$ -Monooxygenase (*Cyp7a1*) beobachtet, wohingegen die Genexpression des Cholesterin-Seitenketten-Spaltungsenzyms (*Cyp11a1*; 0,02-fach) eine Expressionsabnahme im Nierengewebe der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse aufwies. Für die Expressionsraten von Interleukin 4 (*Il4*; 0,48-fach) und vom Peroxisom-Proliferator-

aktivierten Rezeptor  $\beta$  (*Nr1c2*; 0,47-fach) wurde im Vergleich zu den Wt-Mäusen eine Reduzierung ermittelt. Darüber hinaus war die Genexpression von Leptin (*Lep*; 0,11-fach) und vom Sterolregulationselement 2 (*Srebf2*; 0,02-fach) ebenfalls im Nierengewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse verglichen mit den Wt-Mäusen deutlich vermindert (s. Tab. 5).

**Tabelle 5: Ergebnisse des RT<sup>2</sup> Profiler PCR-Arrays vom Nierengewebe: Lipoproteinsignal- und Cholesterinstoffwechsel.**

Gen Protein	<i>Abcc6</i> <sup>-/-</sup> /Wt Fold-Change <sup>1</sup>	Kommentar <sup>2</sup>
<b><i>Apoa1</i></b> Apolipoprotein A-I	↑ 2,23	*
<b><i>Apod</i></b> Apolipoprotein D	↓ 0,35	*
<b><i>Cel</i></b> Carboxylesterlipase	↓ 0,16	B
<b><i>Cela3b</i></b> Chymotrypsin-ähnliche Elastasefamilie, Mitglied 3B	↓ 0,39	B
<b><i>Crp</i></b> C-reaktives Protein	↑ 2,35	A
<b><i>Cyp11a1</i></b> Cholesterin-Seitenketten-Spaltungsenzym, mitochondrial	↓ 0,02	B
<b><i>Cyp7a1</i></b> Cholesterin-7 $\alpha$ -Monooxygenase	↑ 9,95	A
<b><i>Il4</i></b> Interleukin 4	↓ 0,48	B
<b><i>Lep</i></b> Leptin	↓ 0,11	A
<b><i>Nr1c2</i></b> Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor $\beta$	↓ 0,47	*
<b><i>Srebf2</i></b> Sterolregulationselement 2	↓ 0,02	*

1: Der Expressionsunterschied (*Fold-Change*) ( $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ ) ist die normalisierte Genexpressionsrate ( $2^{(-\Delta C_T)}$ ) der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Probe geteilt durch die normalisierte Genexpressionsrate ( $2^{(-\Delta C_T)}$ ) der Wt-Probe.

2: \*: Der gemittelte  $C_T$ -Wert liegt in beiden Proben (Wt oder *Abcc6*<sup>-/-</sup>) unter 30.

A: Der gemittelte  $C_T$ -Wert ist hoch ( $> 30$ ) in einer der Proben (Wt oder *Abcc6*<sup>-/-</sup>) und verhältnismäßig gering in der anderen Probe ( $< 30$ ).

B: Der gemittelte  $C_T$ -Wert ist hoch ( $> 30$ ) in beiden Proben (Wt oder *Abcc6*<sup>-/-</sup>) und das relative Expressionslevel ist in beiden Proben gering.

C: Der gemittelte  $C_T$ -Wert ist entweder nicht bestimmbar oder höher als der *Cut-Off*-Wert ( $C_T$ -Wert 35) in beiden Proben (Wt oder *Abcc6*<sup>-/-</sup>) und eine Expression somit nicht detektierbar war.



### 3.3.4 Expressionsveränderungen von Genen des Lipoproteinsignal- und des Cholesterinstoffwechsels im weißen Fettgewebe

Die Tabelle 6 zeigt, dass die Genexpression einer Vielzahl von Genen des Lipoproteinsignal- und Cholesterinstoffwechsels im weißen Fettgewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse verglichen mit den Wt-Mäusen reguliert war. Es kam zu einem 7-fachen Anstieg der *Apoa1* mRNA-Expression im Fettgewebe der 12 Monate alten *Abcc6*-defizienten Mäuse. Andere Apolipoproteine wie Apolipoprotein A-II (*Apoa2*; 0,17-fach), Apolipoprotein A-IV (*Apoa4*; 0,02-fach), Apolipoprotein B (*Apob*; 0,22-fach), Apolipoprotein C-III (*Apoc3*; 0,33-fach) und Apolipoprotein F (*ApoF*; 0,07-fach) wurden vermindert im Fettgewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den Wt-Mäusen exprimiert. Die Genexpressionsrate von drei der sechs analysierten P450-Cytochrome wies eine Reduktion im weißen Fettgewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse auf (s. Tab. 6). Zu den reprimierten Cytochromen zählten *Cyp7a1* (0,06-fach), *Cyp11a1* (0,01-fach) und Cholesterin-24-Hydroxylase (*Cyp46a1*; 0,43-fach). Analog zum Leber- und Nierengewebe war die relative Genexpression von *Cela3b* (0,39-fach) auch im Fettgewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den Wt-Mäusen herunterreguliert. Allerdings kam es zu einem 10-fachen Anstieg der relativen Expression des *Cel*-Gens im weißen Fettgewebe der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse. Der Nukleäre-Rezeptor, Unterfamilie 0, Gruppe B, Mitglied 2 (*Nr0b2*; 0,03-fach) und der Gallensäure-Rezeptor (*Nr1h4*; 0,40-fach) wurden im Fettgewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse in Bezug auf die Wt-Mäuse reduziert exprimiert. Auch die Genexpression der Transferasen Sterol-O-Acyltransferase 1 (*Soat1*; 0,21-fach) und Sterol-O-Acyl-transferase 2 (*Soat2*; 0,40-fach) sank im weißen Fettgewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den Wt-Mäusen. Die Gene *Hmgcr* (0,41-fach) und 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Synthase 2 (*Hmgcs2*; 0,34) wurden ebenfalls vermindert im Fettgewebe der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse verglichen mit den Wt-Mäusen exprimiert. Zudem wurden Abnahmen der relativen Genexpression von der Aldo-Keto-Reduktase, Familie 1, Mitglied D1 (*Akr1d1*; 0,14-fach), *Ankra2* (0,02-fach), *Crp* (0,30-fach) und NPC1-ähnliches Protein 1 (*Npc1l1*; 0,44-fach) in der PCR-Array-Analyse im weißen Fettgewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse in Bezug auf die Wt-Mäuse beobachtet (s. Tab. 6).

**Tabelle 6: Ergebnisse des RT<sup>2</sup> Profiler-PCR-Arrays vom weißen Fettgewebe: Lipoproteinsignal- und Cholesterinstoffwechsel.**

Gen Protein	<i>Abcc6</i> <sup>-/-</sup> /Wt Fold-Change <sup>1</sup>	Kommentar <sup>2</sup>
<b><i>Akr1d1</i></b> Aldo-Keto-Reduktase, Familie 1, Mitglied D1	↓ 0,14	B
<b><i>Ankra2</i></b> Ankyrin-Wiederholungsprotein 2, Familie A	↓ 0,02	*
<b><i>Apoa1</i></b> Apolipoprotein A-I	↑ 6,60	*
<b><i>Apoa2</i></b> Apolipoprotein A-II	↓ 0,17	*
<b><i>Apoa4</i></b> Apolipoprotein A-IV	↓ 0,02	A
<b><i>Apob</i></b> Apolipoprotein B	↓ 0,22	A
<b><i>Apoc3</i></b> Apolipoprotein C-III	↓ 0,33	*
<b><i>Apof</i></b> Apolipoprotein F	↓ 0,07	A
<b><i>Cel</i></b> Carboxylesterlipase	↑ 10,35	B
<b><i>Cela3b</i></b> Chymotrypsin-ähnliche Elastasefamilie, Mitglied 3B	↓ 0,39	B
<b><i>Crp</i></b> C-reaktives Protein	↓ 0,30	A
<b><i>Cyp11a1</i></b> Cholesterin-Seitenketten-Spaltungsenzym, mitochondrial	↓ 0,01	A
<b><i>Cyp46a1</i></b> Cholesterin-24-Hydroxylase	↓ 0,43	A
<b><i>Cyp7a1</i></b> Cholesterin-7 $\alpha$ -Monooxygenase	↓ 0,06	B
<b><i>Hmgcr</i></b> 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase	↓ 0,41	*
<b><i>Hmgcs2</i></b> 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Synthase 2	↓ 0,34	*
<b><i>Npc1l1</i></b> NPC1-ähnliches Protein 1	↓ 0,45	B
<b><i>Nr0b2</i></b> Nukleärer Rezeptor, Unterfamilie 0, Gruppe B, Mitglied 2	↓ 0,03	A

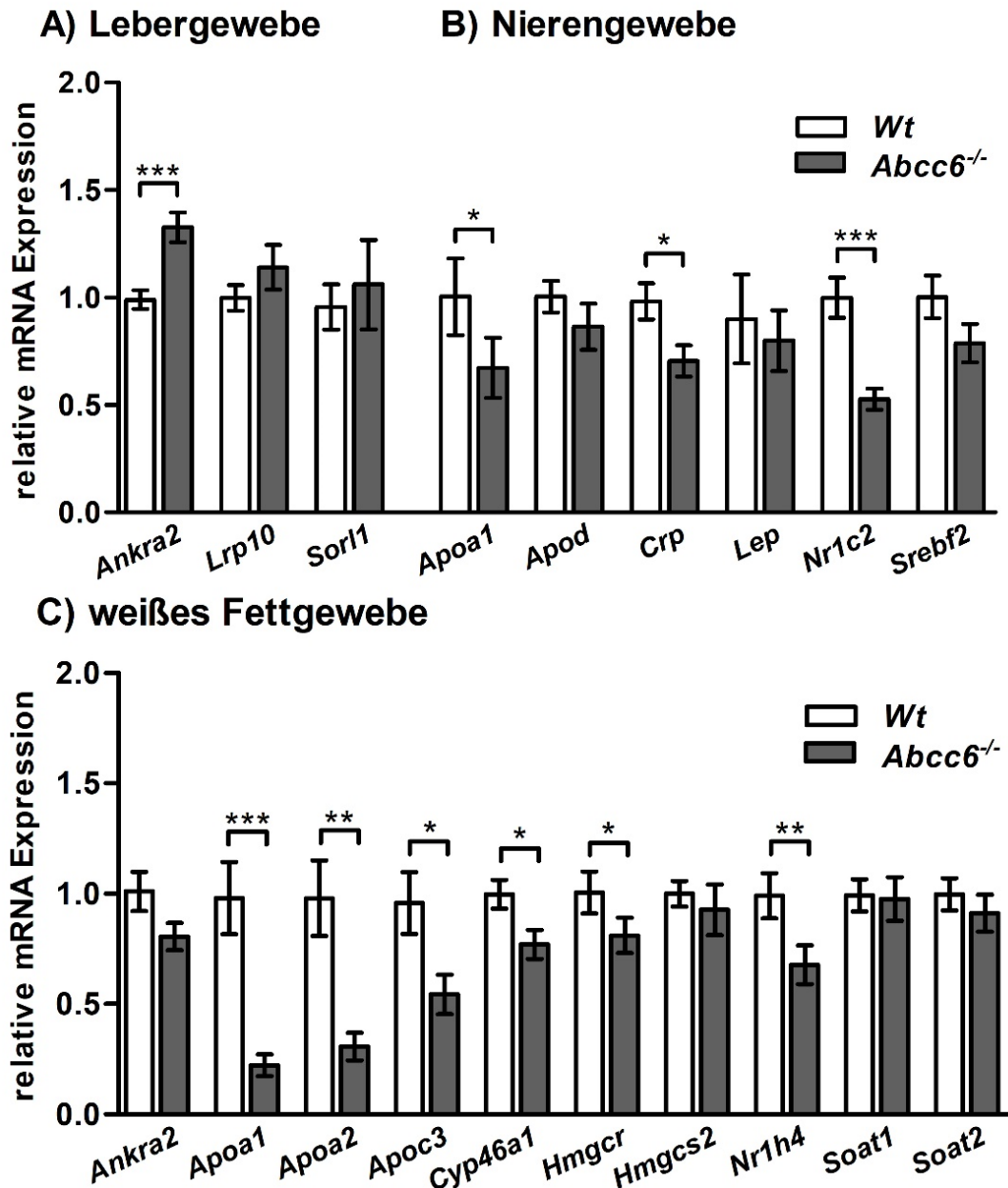
**Fortsetzung der Tabelle 6: Ergebnisse des RT<sup>2</sup> Profiler-PCR-Arrays vom weißen Fettgewebe: Lipoproteinsignal- und Cholesterinstoffwechsel.**

Gen Protein	<i>Abcc6</i> <sup>-/-</sup> /Wt <i>Fold-Change</i> <sup>1</sup>	Kommentar <sup>2</sup>
<b><i>Nr1h4</i></b> Gallensäure-Rezeptor	↓ 0,40	*
<b><i>Soat1</i></b> Sterol-O-Acyltransferase 1	↓ 0,21	*
<b><i>Soat2</i></b> Sterol-O-Acyltransferase 2	↓ 0,40	A

- 1: Der Expressionsunterschied (*Fold-Change*) ( $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ ) ist die normalisierte Genexpressionsrate ( $2^{(-\Delta C_T)}$ ) der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Probe geteilt durch die normalisierte Genexpressionsrate ( $2^{(-\Delta C_T)}$ ) der Wt-Probe.
- 2: \*: Der gemittelte C<sub>T</sub>-Wert liegt in beiden Proben (Wt oder *Abcc6*<sup>-/-</sup>) unter 30.  
 A: Der gemittelte C<sub>T</sub>-Wert ist hoch (> 30) in einer der Proben (Wt oder *Abcc6*<sup>-/-</sup>) und verhältnismäßig gering in der anderen Probe (< 30).  
 B: Der gemittelte C<sub>T</sub>-Wert ist hoch (> 30) in beiden Proben (Wt oder *Abcc6*<sup>-/-</sup>) und das relative Expressionslevel ist in beiden Proben gering.  
 C: Der gemittelte C<sub>T</sub>-Wert ist entweder nicht bestimmbar oder höher als der *Cut-Off*-Wert (C<sub>T</sub>-Wert 35) in beiden Proben (Wt oder *Abcc6*<sup>-/-</sup>) und eine Expression somit nicht detektierbar war.

### 3.3.5 Verifikation der PCR-Array-Analyse im Leber-, Nieren- und Fettgewebe

Um die PCR-Array-Analyse zu verifizieren wurden die Expressionsraten ausgewählter Gene im Leber-, im Nieren- und im weißen Fettgewebe 12 Monate alter Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse mittels quantitativer *real-time* PCR (qPCR) untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 13A, 13B und 13C dargestellt, Zum einen wurden nur Gene analysiert, deren Expressionsrate im Gewebe der *Abcc6-Knockout*-Mäuse verglichen mit den Wt-Mäusen  $\geq 2$ -fach oder  $\leq 0,5$ -fach in der PCR-Array-Analyse reguliert waren. Einige Ergebnisse des PCR-Arrays waren nahe der Detektionsgrenze und daher teilweise falsch positiv und konnten in der qPCR-Analyse nicht bestätigt werden. Dies zeigt, dass eine Verifikation von Array-Analysen durch sekundäre Untersuchungsmethoden unerlässlich ist [203]. Die Expressionsdaten der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden auf die Expressionsraten aller Wt-Mäuse bezogen, deren Messwerte auf eins normiert wurden (s. Abb. 13A, 13B und 13C).

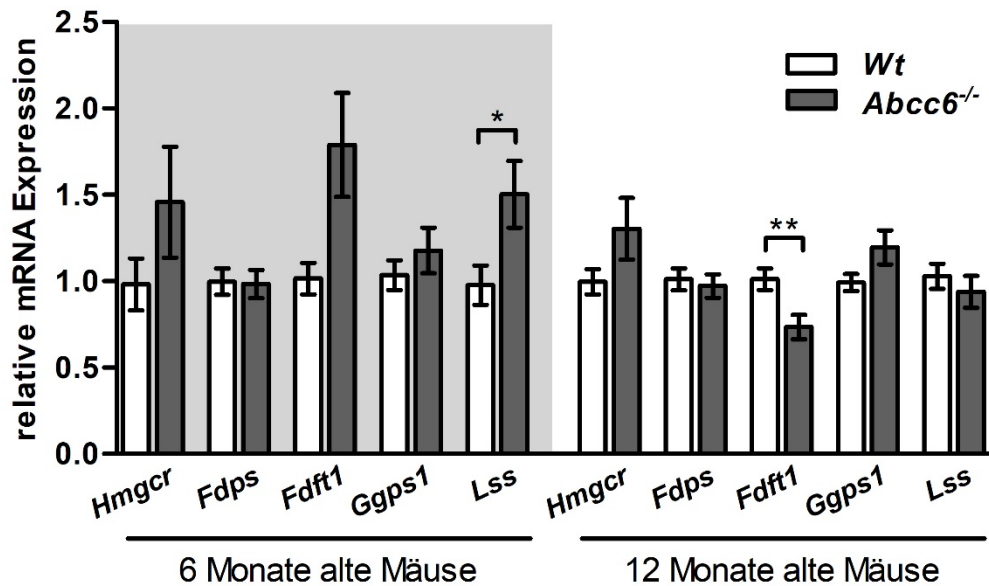


**Abbildung 13: Verifikation der PCR-Array-Analyse im Leber-, Nieren- und weißen Fettgewebe 12 Monate alter Mäuse mittels quantitativer real-time PCR.** Relative Quantifizierung der mRNA-Expression ausgewählter Zielgene der PCR-Array-Analyse für das A) Lebergewebe, B) Nierengewebe und C) weißes Fettgewebe 12 Monate alter Wt- und Abcc6-defizienter Mäuse (Wt: Leber n=37, Niere n=34, Fett n=33; Abcc6<sup>-/-</sup>: Leber n=39, Niere n=42, Fett n=38). Abgebildet sind die normalisierten Expressionsraten der Gene A) Ankyrin-Wiederholungsprotein 2, Familie A (*Ankra2*), Low-density lipoprotein-Rezeptor-bezogenes Protein 10 (*Lrp10*), Sortilin-bezogener Rezeptor 1 (*Sorl1*) B) Apolipoprotein A-I (*Apoa1*), Apolipoprotein D (*Apod*), C-reaktives Protein (*Crp*), Leptin (*Lep*), Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor  $\beta$  (*Nr1c2*), Sterolregulationselement 2 (*Srebf2*) und C) *Ankra2*, *Apoa1*, Apolipoprotein A-II (*Apoa2*), Apolipoprotein C-III (*Apoc3*), *Crp*, Cholesterin-24-Hydroxylase (*Cyp46a1*), 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase (*Hmgcr*), 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Synthase 2 (*Hmgcs2*), Gallensäure-Rezeptor (*Nr1h4*), Sterol-O-Acyltransferase 1 (*Soat1*) und Sterol-O-Acyltransferase 2 (*Soat2*). Die ermittelten relativen Genexpressionen der Abcc6<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden auf die Genexpressionen aller Wt-Mäuse normiert, welche auf 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Die statistischen Signifikanzen wurden mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test berechnet (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ).

Übereinstimmend mit der PCR-Array-Analyse wurde im Lebergewebe der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse eine signifikante *Ankra2* Genexpressionserhöhung von  $1,3 \pm 0,07$  im Vergleich zu den Wt-Mäusen ermittelt (s. Abb. 13A). Auch eine moderate Zunahme der relativen *Lrp10*- und *Sorl1*-Expression konnte gezeigt werden. Im Nierengewebe der *Abcc6*-Knockout-Mäuse wurden die Gene *Apoa1* und *Crp* signifikant geringer exprimiert ( $0,7\text{-fach} \pm 0,10$ ) als in den Wt-Mäusen. Eine Verringerung der relativen Expression von *Apod*, *Lep* und *Srebf2* im Nierengewebe der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse verglichen mit den Wt-Mäusen konnte reproduziert werden. Für das Gen *Nr1c2* wurde eine  $0,5\text{-fache} \pm 0,05$  Abnahme der Genexpressionsrate im Nierengewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse in Bezug auf die Wt-Mäuse detektiert (s. Abb. 13B). Ergänzend dazu stellt Abbildung 13C die Resultate der qPCR-Messung zur Verifikation der PCR-Array-Analyse des weißen Fettgewebes dar. Insgesamt ist auffällig, dass die Expressionsrate aller verifizierter Zielgene im Fettgewebe der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den Wt-Mäusen erniedrigt war. Die relative Genexpression von *Apoa1* und *Apoa2* im Fettgewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse sank im Vergleich zu den Wt-Mäusen signifikant um mehr als die Hälfte, auf das  $0,2\text{-Fache} \pm 0,05$  und  $0,3\text{-Fache} \pm 0,06$ . Für die Transkriptrate von *Apoc3* konnte im weißen Fettgewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse eine signifikante Reduktion um das  $0,5\text{-Fache} \pm 0,09$  festgestellt werden. In Abbildung 13C ist ersichtlich, dass eine signifikant niedrigere Expressionsrate des *Hmgcr*-Gens ( $0,8\text{-fach} \pm 0,08$ ) und des *Cyp46a1*-Gens ( $0,8\text{-fach} \pm 0,07$ ) nachzuweisen war. Eine signifikante Expressionsverringerung im Fettgewebe der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse in Bezug auf die Wt-Mäuse wurde ebenso für *Nr1h4* ( $0,7\text{-fach} \pm 0,09$ ) belegt. Eine gleiche Tendenz, jedoch ohne statistische Signifikanz, wies die relative Expression der Gene *Ankra2*, *Hmgc2* und *Soat2* auf (s. Abb. 13C). Es konnte keine Regulation der mRNA-Expression des *Soat1*-Gens im weißen Fettgewebe der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse verglichen mit den Wt-Mäusen detektiert werden (s. Abb. 13C).

### 3.3.6 Genexpressionsanalyse von Schlüsselenzymen der Cholesterinbiosynthese im Lebergewebe

Zur Untersuchung der Cholesterinbiosynthese bei einer *Abcc6*-Defizienz wurden 6 Monate und 12 Monate alten Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen die Leber entnommen und die Expressionsrate wichtiger Enzyme dieses Stoffwechselweges analysiert. Die Expressionsraten der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden auch hier auf die Expressionsraten aller Wt-Mäuse bezogen, deren Messwerte auf eins normiert wurden (s. Abbildung 14).



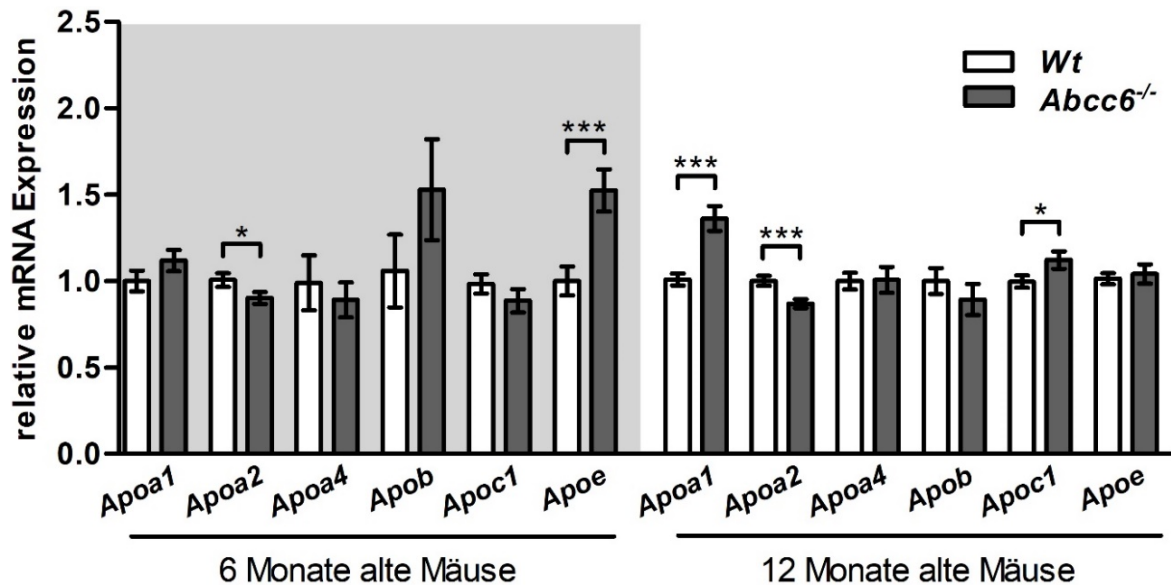
**Abbildung 14: Genexpressionsanalyse der Cholesterinbiosynthese des Lebergewebes 6 Monate und 12 Monate alter Mäuse.** Relative Quantifizierung der mRNA-Expression der Schlüsselenzyme der Cholesterinbiosynthese im Lebergewebe 6 Monate und 12 Monate alter Wt- und *Abcc6*-defizienter Mäuse (6 Monate alte Mäuse: Wt n = 22, *Abcc6*<sup>-/-</sup> n = 25; 12 Monate alte Mäuse: Wt n = 37, *Abcc6*<sup>-/-</sup> n = 39). Abgebildet sind die normalisierten Expressionsraten der Gene 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A (*Hmgcr*), Farnesyl-pyrophosphatsynthase (*Fdps*), Squalensynthase (*Fdft1*), Geranylgeranylpyrophosphatsynthase 1 (*Ggps1*) und Lanosterinsynthase (*Lss*). Die ermittelten relativen Genexpressionen der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden auf die Genexpressionen aller Wt-Mäuse normiert, welche auf 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Die statistischen Signifikanzen wurden mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test berechnet (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ).

In Abbildung 14 ist eine geringe Erhöhung der relativen Genexpression des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms *Hmgcr* zu sehen, 1,5-fach  $\pm 0,32$  in den 6 Monate alten und 1,3-fach  $\pm 0,18$  in den 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen verglichen mit den gleichaltrigen Wt-Mäusen. Die Expressionsrate des *Fdps*-Gens weist weder im Lebergewebe der 6 Monate, noch im Lebergewebe der 12 Monate alten *Abcc6*-Knockout-Mäusen im Vergleich zu den Wt-Mäusen eine veränderte Genexpression auf (s. Abb. 14). Ein gegenläufiger Trend wurde in beiden Altersgruppen für die mRNA-Expression von *Fdft1* gezeigt. Im Lebergewebe der 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Genexpression von *Fdft1* um das 1,8-Fache  $\pm 0,30$  erhöht und im Gewebe der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant um das 0,7-Fache  $\pm 0,07$  supprimiert. Die relative mRNA-Expression von *Ggps1* wurde in beiden Altersklassen im Vergleich zu den Wt-Mäusen um das 1,2-Fache  $\pm 0,11$  induziert. Eine signifikante Expressionssteigerung auf das 1,5-Fache  $\pm 0,19$  wurde für *Lss* nur in den 6 Monate alten und nicht in den 12 Monate alten *Abcc6*-defizienten Mäusen beobachtet (s. Abb. 14).

### 3.3.7 Expressionsveränderung der Apolipoproteine bei einer *Abcc6*-Defizienz

Die Untersuchung des HDL-Cholesterins zeigte im Serum der 6 Monate und 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den entsprechenden Wt-Mäusen eine Erniedrigung. Infolgedessen wurde die Expression der Apolipoproteine, die ein wesentlicher Bestandteil der Lipoproteine sind, analysiert. Zunächst wurde ein Genexpressionsprofil selektierter Apolipoproteine *Apoa1*, *Apoa2*, *Apoa4*, *Apob*, *Apoc1* und *Apoe* für das Lebergewebe 6 Monate und 12 Monate alter Wt- und *Abcc6*-defizienter Mäuse erstellt, da die Leber das primäre Organ für die Apolipoproteinsynthese ist [204]. Die Expressionsraten der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden auf die Expressionsraten aller Wt-Mäuse bezogen, deren Messwerte auf eins normiert wurden (s. Abb. 15).

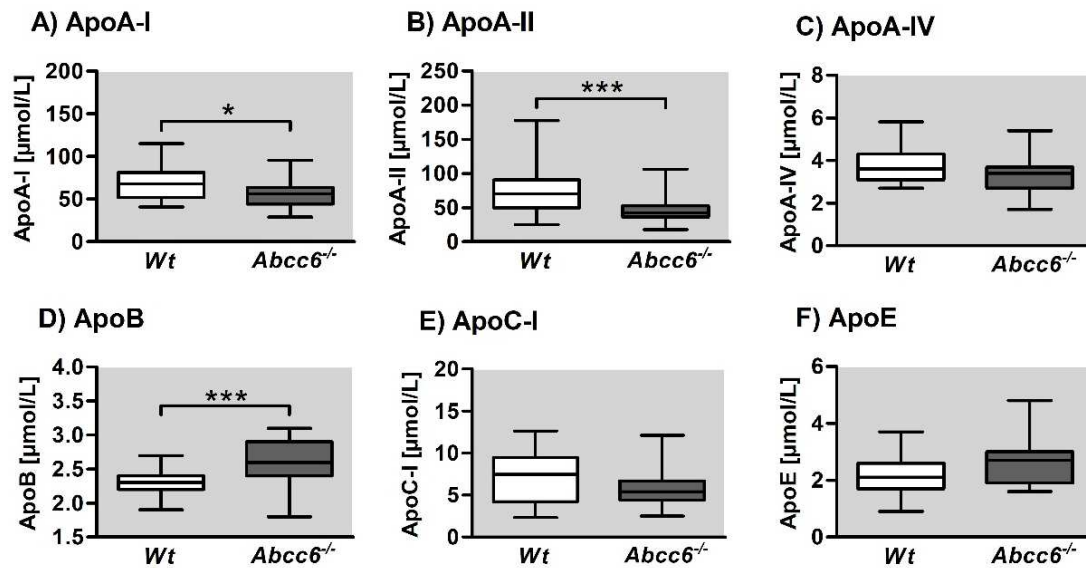
Wie in Abbildung 15 zu sehen, kam es im Lebergewebe der 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse in Bezug auf die Wt-Mäuse zu einer geringfügigen Induktion der *Apoa1*-Genexpression um das 1,1-Fache  $\pm 0,06$ . Es konnte eine 1,5-fache Expressionssteigerung von *Apob* ( $\pm 0,29$ ) und von *Apoe* ( $\pm 0,12$ ) im Lebergewebe der 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse verglichen mit den Wt-Mäusen festgestellt werden. In Abbildung 15 sind eine signifikante Reduktion der Genexpression von *Apoa2* ( $\pm 0,03$ ) um das 0,9-Fache sowie eine nicht signifikante Abnahme der relativen mRNA-Expression von *Apoa4* ( $\pm 0,10$ ) und *Apoc1* ( $\pm 0,07$ ) ebenfalls um das 0,9-Fache im Lebergewebe der 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse gezeigt. Im Lebergewebe der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden eine signifikante Induktion des *Apoa1*-Gens (1,4-fach  $\pm 0,07$ ) sowie eine signifikante Expressionserhöhung des *Apoc1*-Gens (1,1-fach  $\pm 0,05$ ) verglichen mit den gleichaltrigen Wt-Mäusen detektiert. Im Gegensatz dazu wurde eine erniedrigte Genexpression von *Apoa2* ( $\pm 0,03$ ) und *Apob* ( $\pm 0,09$ ) um das 0,9-Fache im Lebergewebe der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse festgestellt. Die Gene *Apoa4* und *Apoe* des Lebergewebes waren in den 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den gleichaltrigen Wt-Mäusen nicht reguliert (s. Abb. 15).



**Abbildung 15: Genexpressionsanalyse der Apolipoproteine des Lebergewebes 6 Monate und 12 Monate alter Mäuse.** Relative Quantifizierung der mRNA-Expression der Apolipoproteine im Lebergewebe 6 Monate und 12 Monate alter Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup> Mäuse (6 Monate alte Mäuse: Wt: n = 22, *Abcc6*<sup>-/-</sup>: n = 25; 12 Monate alte Mäuse: Wt: n = 37, *Abcc6*<sup>-/-</sup>: n = 39). Abgebildet sind die normalisierten Expressionsraten der Apolipoproteine (Apo) *Apoa1*, *Apoa2*, *Apoa4*, *ApoB*, *ApoC1* und *ApoE*. Die ermittelten relativen Genexpressionen der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden auf die Genexpressionen aller Wt-Mäuse normiert, welche auf 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Die statistischen Signifikanzen wurden mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test berechnet (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ).

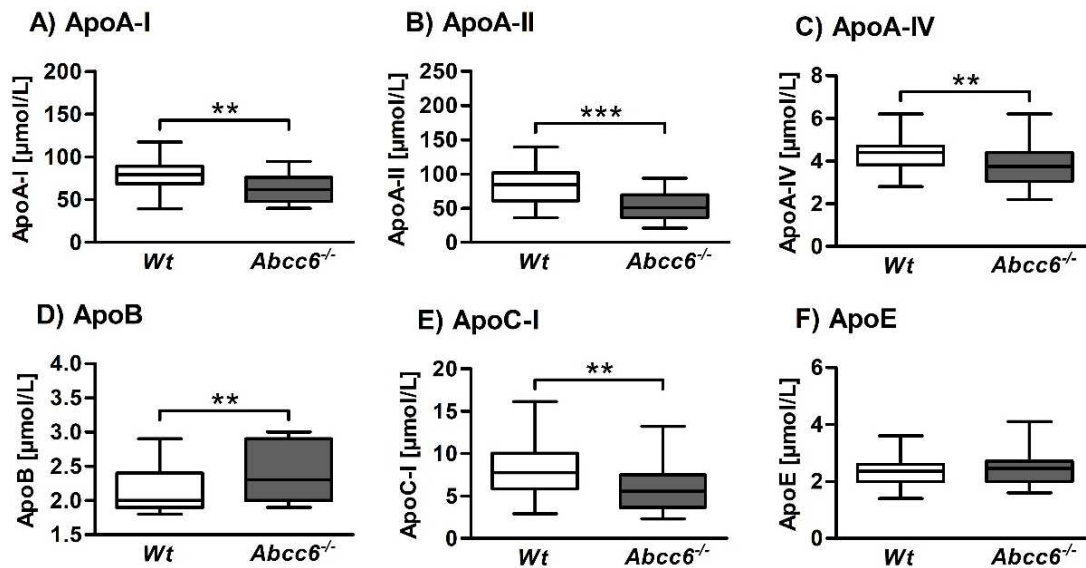
Anschließend erfolgte eine massenspektrometrische Konzentrationsbestimmung der Apolipoproteine im Serum der 6 Monate und 12 Monate alten Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse (s. Abb. 16 und 17). Die ApoA-I-Konzentration sank im Serum der 6 Monate alten *Abcc6*-defizienten Mäuse verglichen mit den Wt-Mäusen signifikant (Wt  $68,96 \pm 3,34 \mu\text{mol/L}$  vs. *Abcc6*<sup>-/-</sup>  $56,61 \pm 3,56 \mu\text{mol/L}$ ; s. Abb. 16A). Die größte Konzentrationsabnahme wurde für das ApoA-II im Serum der 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse ermittelt (Wt  $72,88 \pm 6,00 \mu\text{mol/L}$  vs. *Abcc6*<sup>-/-</sup>  $46,88 \pm 4,74 \mu\text{mol/L}$ ; s. Abb. 16B). Auch der ApoC-I-Gehalt war im Serum der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse in Bezug auf die Wt-Mäuse erniedrigt, jedoch statistisch nicht signifikant (s. Abb. 16E). Im Gegensatz dazu war die Serumkonzentration von ApoB in den 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den Wt-Mäusen signifikant erhöht (Wt  $2,33 \pm 0,04 \mu\text{mol/L}$  vs. *Abcc6*<sup>-/-</sup>  $2,62 \pm 0,08 \mu\text{mol/L}$ ; s. Abb. 16D). Die Konzentration von ApoA-IV und ApoE im Serum der 6 Monate alten *Abcc6*-Knockout-Mäuse unterschied sich nicht signifikant von den gleichaltrigen Wt-Mäusen (s. Abb. 16C und F).





**Abbildung 16: Quantifizierung der Apolipoprotein-Konzentrationen im Serum 6 Monate alter Mäuse.** Die Konzentration der Apolipoproteine (Apo) ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoB, ApoC-I und ApoE im Serum 6 Monate alter Wt- und Abcc6-defizienter Mäuse wurden mittels Massenspektrometrie quantifiziert (Wt: n = 28, Abcc6<sup>-/-</sup>: n = 19). Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Die statistischen Signifikanzen wurden mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test berechnet (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ).

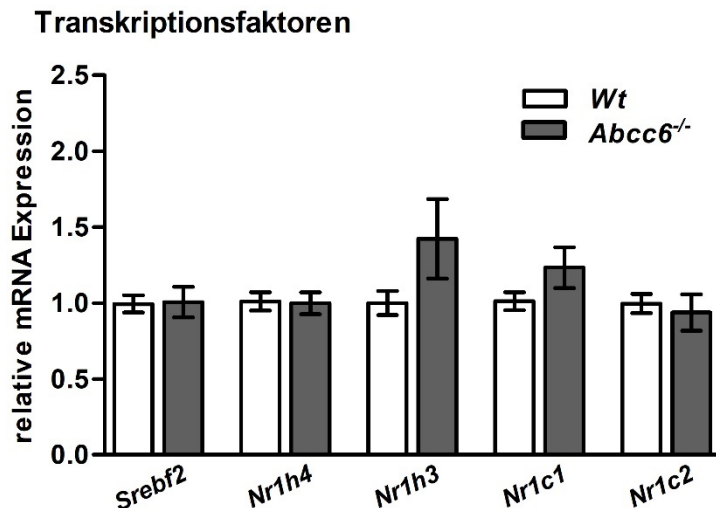
Die Abbildungen 17A bis 17C zeigen eine signifikante Konzentrationsabnahme von ApoA-I (Wt  $77,55 \pm 2,79 \mu\text{mol/L}$  vs. Abcc6<sup>-/-</sup>  $63,49 \pm 2,68 \mu\text{mol/L}$ ), ApoA-II (Wt  $81,86 \pm 3,97 \mu\text{mol/L}$  vs. Abcc6<sup>-/-</sup>  $54,23 \pm 3,54 \mu\text{mol/L}$ ) sowie ApoA-IV (Wt  $4,29 \pm 0,11 \mu\text{mol/L}$  vs. Abcc6<sup>-/-</sup>  $3,78 \pm 0,14 \mu\text{mol/L}$ ) im Serum 12 Monate alter Abcc6<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den Wt-Mäusen. Im Gegensatz dazu war der Gehalt von ApoB im Serum der 12 Monate alten Abcc6<sup>-/-</sup>-Mäuse in Bezug auf die Wt-Mäuse signifikant erhöht (Wt  $2,18 \pm 0,05 \mu\text{mol/L}$  vs. Abcc6<sup>-/-</sup>  $2,45 \pm 0,06 \mu\text{mol/L}$ ; s. Abb. 17D). Darüber hinaus war die ApoC-I-Konzentration im Serum der 12 Monate alten Abcc6<sup>-/-</sup>-Mäuse signifikant reduziert (Wt  $7,78 \pm 0,44 \mu\text{mol/L}$  vs. Abcc6<sup>-/-</sup>  $5,85 \pm 0,38 \mu\text{mol/L}$ ; s. Abb. 17E). Es konnte keine Konzentrationsveränderung für das ApoE im Serum der Abcc6<sup>-/-</sup>-Mäuse verglichen mit den Wt-Mäusen festgestellt werden (s. Abb. 17F).



**Abbildung 17: Quantifizierung der Apolipoprotein-Konzentrationen im Serum 12 Monate alter Mäuse.** Die Konzentration der Apolipoproteine (Apo) ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoB, ApoC-I und ApoE im Serum 12 Monate alter Wt- und Abcc6-defizienter Mäuse wurden mittels Massenspektrometrie quantifiziert (Wt: n = 41, Abcc6<sup>-/-</sup>: n = 40). Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Die statistischen Signifikanzen wurden mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test berechnet (\*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ).

### 3.3.8 Expressionsanalyse der Transkriptionsfaktoren im Lebergewebe 12 Monate alter Abcc6-defizienter Mäuse

Viele Proteine des Cholesterinmetabolismus werden auf transkriptionaler und auf post-transkriptionaler Ebene reguliert [167], wie unter anderem die Gene *HMGCR* und *LDLR*. Die Expression dieser Gene wird beispielsweise durch Transkriptionsfaktoren der SREBP-Familie und durch den zellulären Cholesteringehalt gesteuert [205,206]. Auch nukleäre Rezeptoren sind regulatorisch an der Cholesterinhomöostase beteiligt, indem diese durch Oxysterine, Steroide und Gallensäuren aktiviert werden und als Dimere die Gentranskription beeinflussen [172]. In diesem Teil wurde daher die Expression ausgewählter Transkriptionsfaktoren im Lebergewebe 12 Monate alter Wt- und Abcc6-Knockout-Mäuse untersucht. Die Expressionsraten der Abcc6<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden auf die Expressionsraten aller Wt-Mäuse bezogen, deren Messwerte auf eins normiert wurden (s. Abb. 18). Es konnte keine Veränderung der relativen mRNA-Expression von *Srebf2* und *Nr1h4* im Lebergewebe der 12 Monate alten Abcc6<sup>-/-</sup>-Mäuse in Bezug auf die Wt-Mäuse nachgewiesen werden (s. Abb. 18).



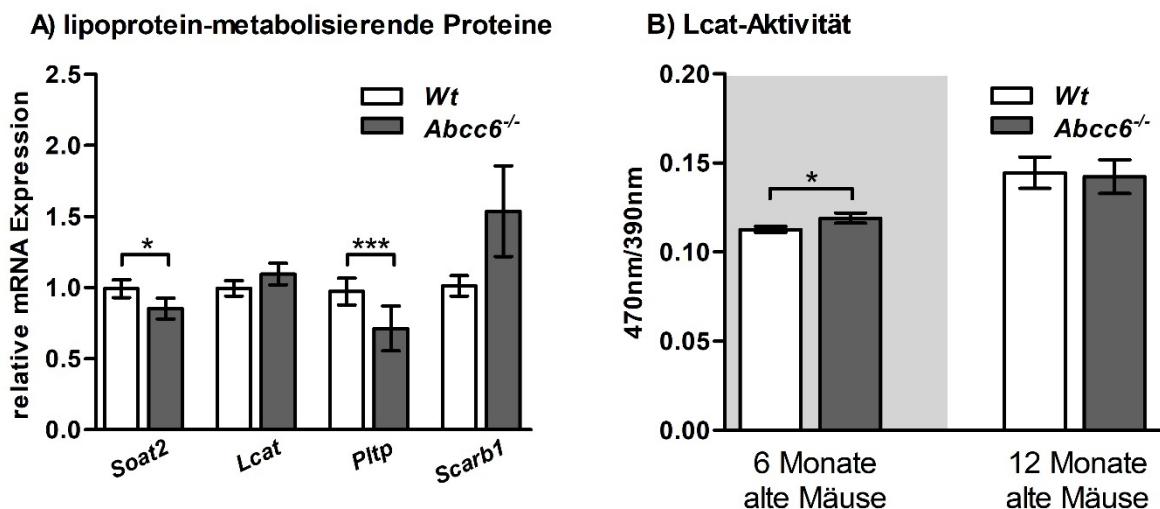
**Abbildung 18: Genexpressionsanalyse der Transkriptionsfaktoren im Lebergewebe 12 Monate alter Mäuse.** Relative Quantifizierung der mRNA-Expression von Transkriptionsfaktoren im Lebergewebe 12 Monate alter Wt- und Abcc6-defizienter Mäuse (Wt n = 37, Abcc6<sup>-/-</sup> n = 39). Abgebildet sind die normalisierten Expressionsraten der Gene Sterolregulationselement 2 (*Srebf2*), Gallensäure-Rezeptor (*Nr1h4*, auch Farnesoid-X-Rezeptor  $\alpha$ ), Oxysterin-Rezeptor LXR  $\alpha$  (*Nr1h3*), Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor  $\alpha$  (*Nr1c1*), Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor  $\beta$  (*Nr1c2*). Die ermittelten relativen Genexpressionen der Abcc6<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden auf die Genexpressionen aller Wt-Mäuse normiert, welche auf 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Die statistischen Signifikanzen wurden mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test berechnet.

Die Abbildung 18 zeigt eine nicht signifikante, 1,4-fache  $\pm 0,26$  Zunahme der Genexpressionsrate von *Nr1h3* im Lebergewebe 12 Monate alter Abcc6<sup>-/-</sup>-Mäuse verglichen mit den Wt-Mäusen. Auch die relative Genexpression von *Nr1c1* war im Lebergewebe der Abcc6<sup>-/-</sup>-Mäuse um das 1,2-Fache  $\pm 0,14$  erhöht, allerdings ebenfalls statistisch nicht signifikant. Für die relative Expression von *Nr1c2* im Lebergewebe der 12 Monate alten Abcc6<sup>-/-</sup>-Mäuse wurde im Vergleich zu den Wt-Mäusen eine geringfügige Suppression (0,9-fach  $\pm 0,12$ ) detektiert, wenngleich diese nicht statistisch signifikant war (s. Abb. 18).

### 3.3.9 Untersuchung von lipoprotein-metabolisierenden Enzymen bei einer Abcc6-Defizienz

Zunächst wurde eine Analyse des Genexpressionsprofils von lipoprotein-metabolisierenden Proteinen im Lebergewebe von 12 Monate alten Wt- und Abcc6<sup>-/-</sup>-Mäusen durchgeführt. Die Expressionsraten der Abcc6<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden auf die Expressionsraten aller Wt-Mäuse bezogen, deren Messwerte auf eins normiert wurden (s. Abb. 19A). Die Expressionsrate von *Soat2* im Lebergewebe der 12 Monate alten Abcc6<sup>-/-</sup>-Mäuse war verglichen zu den Wt-Mäusen signifikant 0,9-fach  $\pm 0,07$  reprimiert.

Eine statistisch signifikante Abnahme der Genexpression um das 0,7-Fache  $\pm 0,16$  konnte im Lebergewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse ebenfalls für *Pltp* beobachtet werden (s. Abb. 19A). Die Expression des HDL-Rezeptors *Scarb1* wurde 1,5-fach  $\pm 0,32$  stärker im Lebergewebe der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse als im Lebergewebe der gleichaltrigen Wt-Mäuse exprimiert (s. Abb. 19A). Diese Expressionserhöhung war allerdings statistisch nicht signifikant. Die Abbildung 19A zeigt eine geringe, nicht signifikante Induktion der *Lcat*-Genexpression (1,1-fach  $\pm 0,08$ ) im Lebergewebe 12 Monate alter *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Verhältnis zu den Wt-Mäusen.

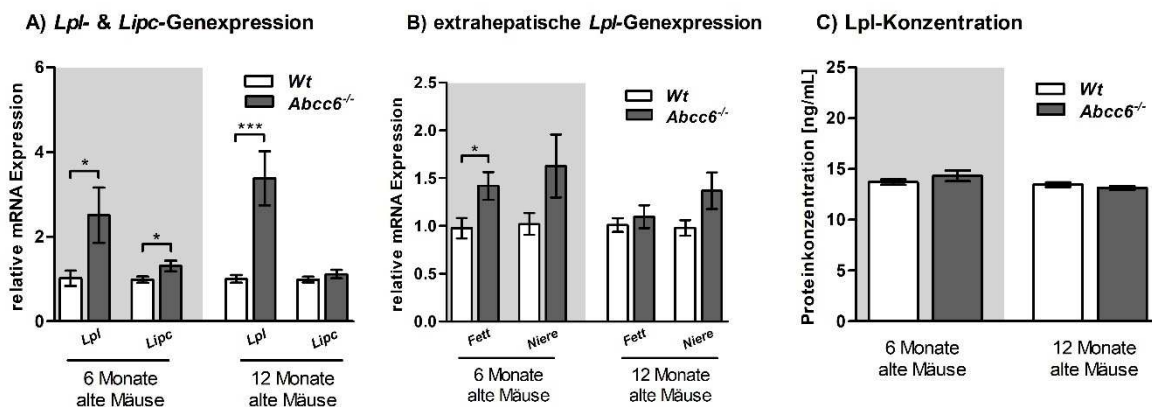


**Abbildung 19: Genexpressionsanalyse der lipoprotein-metabolisierenden Proteinen des Lebergewebes 12 Monate alter Mäuse und Bestimmung der Lcat-Aktivität im Serum 6 Monate und 12 Monate alter Mäuse.** A) Relative Quantifizierung der mRNA-Expression von lipoprotein-metabolisierenden Proteinen im Lebergewebe 12 Monate alter Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-defizienter Mäuse (Wt n = 37, *Abcc6*<sup>-/-</sup> n = 39). Abgebildet sind die normalisierten Expressionsraten der Gene Sterol-O-Acyltransferase (*Soat2*), Phosphatidylcholin-Sterol-Acyltransferase (*Lcat*), Phospholipid-Transferprotein (*Pltp*), Scavenger-Rezeptor B1 (*Scarb1*). Die ermittelten relativen Genexpressionen der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden auf die Genexpressionen aller Wt-Mäuse normiert, welche auf 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM). B) Die Lcat-Aktivität wurde im Serum von 6 Monate und 12 Monate alten Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen (6 Monate alte Mäuse: Wt: n = 22, *Abcc6*<sup>-/-</sup>: n = 15; 12 Monate alte Mäuse: Wt: n = 30, *Abcc6*<sup>-/-</sup>: n = 34) bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte einer Doppelbestimmung und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Die statistischen Signifikanzen wurden mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test berechnet (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ).

Das Enzym Lcat wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert und anschließend ins Blut sekretiert, wo es an der Oberfläche der HDL- und LDL-Partikel freies Cholesterin zum Transport verestert [207]. Daher wurde parallel zur Analyse der *Lcat*-Genexpression (s. Abb. 19A) auch die Aktivität des Enzyms im Serum von 6 Monate und 12 Monate alten Mäusen bestimmt (s. Abb. 19B). In diesem Experiment war bei Vorhandensein des intakten Substrates der Lcat die Signalintensität bei einer Wellenlänge

von 470 nm stärker. Nach der Substrathydrolyse durch die Lcat verschob sich die Signalintensität zu einer Wellenlänge von 390 nm und die Intensität des Signals 470 nm nahm ab. Die Aktivitäten des Lcat-Enzyms im Serum der 6 Monate alten Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse unterschieden sich signifikant. Die Lcat-Aktivität wies eine Abnahme von ca. 5 % im Serum der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse auf. Die Aktivität der Lcat zeigte jedoch im Serum der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den Wt-Mäusen keine signifikante Veränderung (s. Abb. 19B).

Die Lpl wird vornehmlich vom Fettgewebe synthetisiert und dann in den Blutkreislauf sekretiert [208]. Unter bestimmten physiologischen Bedingungen wie der Einwirkung des Tumornekrosefaktors  $\alpha$  oder der Transkriptionsfaktorfamilie PPAR wird Lpl auch verstärkt von der adulten Leber exprimiert [209]. In diesem Teil der Arbeit wurde die *Lpl*-Genexpression im Leber-, Fett- und Nierengewebe und eine Lpl-Proteinkonzentrationsbestimmung im Serum der Wt- und der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse vorgenommen. Die Expressionsraten der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden auch hier auf die Expressionsraten aller Wt-Mäuse bezogen, deren Messwerte auf eins normiert wurden (s. Abb. 20A und 20B).



**Abbildung 20: Genexpressionsanalyse der Lipoproteinlipase und der hepatischen Lipase im Lebergewebe und Bestimmung der Lpl-Proteinkonzentration im Serum 6 Monate und 12 Monate alter Mäuse.** A) Relative Quantifizierung der mRNA-Expression der Gene Lipoproteinlipase (*Lpl*) und hepatische Lipase (*Lipo*) im Lebergewebe 6 Monate und 12 Monate alter Wt- und *Abcc6*-defizienter Mäuse (6 Monate alte Mäuse: Wt: n = 22, *Abcc6*<sup>-/-</sup>: n = 25; 12 Monate alte Mäuse: Wt: n = 37 *Abcc6*<sup>-/-</sup>: n = 39). B) Relative Quantifizierung der mRNA-Expression der *Lpl* im weißen Fett- und Nierengewebe 6 Monate und 12 Monate alter Wt- und *Abcc6*-defizienter Mäuse (6 Monate alte Mäuse: Wt: Fett n = 22, Niere n = 25, *Abcc6*<sup>-/-</sup>: Fett n = 18, Niere n = 23; 12 Monate alte Mäuse: Wt: Fett n = 33, Niere n = 34, *Abcc6*<sup>-/-</sup>: Fett n = 38, Niere n = 42). Die ermittelten normalisierten relativen Genexpressionen der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden auf die Genexpressionen aller Wt-Mäuse normiert, welche auf 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM). C) Die *Lpl*-Proteinkonzentration wurde im Serum von 6 Monate und 12 Monate alten Wt- und *Abcc6*-defizienten Mäusen (6 Monate alte Mäuse: Wt: n = 23, *Abcc6*<sup>-/-</sup>: n = 21; 12 Monate alte Mäuse: Wt: n = 33 *Abcc6*<sup>-/-</sup>: n = 29) mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte einer Doppelbestimmung und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Die statistischen Signifikanzen wurden für A) und B) mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test berechnet (\* = p ≤ 0,05; \*\*\* = p ≤ 0,001).

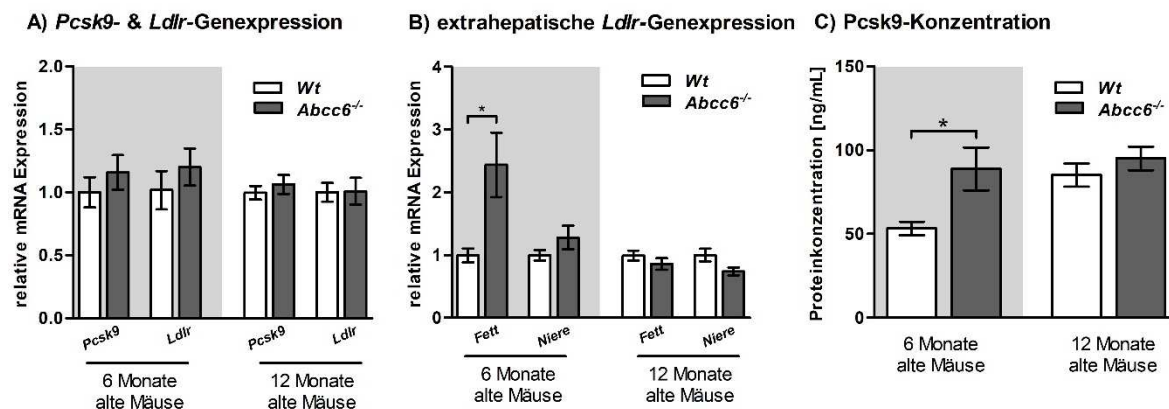
Die Abbildung 20A zeigt die Genexpressionsrate von *Lpl* und *Lipc* des Lebergewebes der 6 Monate und 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den gleichaltrigen Wt-Mäusen. Es sind eine signifikante 2,5-fache  $\pm 0,65$  *Lpl*-Expressionserhöhung im Lebergewebe der 6 Monate alten Mäusen und eine signifikante 3,4-fache  $\pm 0,64$  Expressionssteigerung im Lebergewebe der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen zu sehen (s. Abb. 20A). Die relative Expression des *Lipc*-Gens war im Lebergewebe der 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse signifikant um das 1,3-Fache  $\pm 0,13$  in Bezug auf die Wt-Mäuse erhöht. Im Lebergewebe der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse konnte lediglich ein statistisch nicht signifikanter 1,1-facher  $\pm 0,10$  Anstieg detektiert werden (s. Abb. 20A). Die extrahepatische Expressionsrate von *Lpl* war nur im weißen Fettgewebe der 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse signifikant um das 1,4-Fache  $\pm 0,14$  erhöht (s. Abb. 20B). Das Nierengewebe der 6 Monate und 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse wies im Vergleich zu den entsprechenden Wt-Mäusen zwar eine 1,6-fache  $\pm 0,33$  und 1,4-fache  $\pm 0,19$  Induktion der *Lpl*-Genexpression auf. Allerdings waren diese Expressionssteigerungen statistisch nicht signifikant (s. Abb. 20B). Die *Lpl*-Proteinkonzentrationen im Serum der 6 Monate alten und der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse unterschied sich nicht von den entsprechenden Wt-Mäusen (s. Abbildung 20).

### 3.3.10 Modulation der Pcsk9-Expression bei einer Abcc6-Defizienz

*Pcsk9* reguliert den *Ldlr* negativ und somit auch indirekt den Gehalt an LDL-Cholesterin im Blut durch Hemmung des Rezeptor-Recyclings und durch Förderung von dessen Degradation [210]. Es wurde die Expressionsrate beider Gene im Lebergewebe von 6 Monate und von 12 Monate alten Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen untersucht. Zusätzlich wurde die extrahepatische Expression von *Ldlr* im Fett- und Nierengewebe analysiert. Die Expressionsraten der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden wieder auf die Expressionsraten aller Wt-Mäuse bezogen, deren Messwerte auf eins normiert wurden (s. Abb. 21A und 21B). Parallel dazu wurde der *Pcsk9*-Gehalt im murinen Serum beider Altersklassen quantifiziert (s. Abb. 21C). Weder *Pcsk9*, noch *Ldlr* wiesen im Lebergewebe der 6 Monate alten und 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse verglichen mit den gleichaltrigen Wt-Mäusen eine signifikant veränderte Genexpressionsrate auf (s. Abb. 21A). Für die *Ldlr*-Genexpression im weißen Fettgewebe der 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse konnte im Vergleich zu den Wt-Mäusen eine signifikante 2,4-fache  $\pm 0,51$  Steigerung beobachtet werden. Auch das Nierengewebe der 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse wies eine Erhöhung der *Ldlr*-Genexpressionsrate von  $1,3 \pm 0,19$  auf, wobei diese aber statistisch nicht signifikant war (s. Abb. 21B). In den extrahepatischen Geweben der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse lag die relative *Ldlr*-Expression in Bezug auf die Wt-Mäuse reduziert vor, wenngleich statistisch nicht signifikant (s. Abb. 21B).



Für die Pcsk9-Proteinkonzentration im Serum der 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse konnte im Vergleich zu den Wt-Mäusen ein signifikanter Anstieg festgestellt werden (Wt  $53,30 \pm 3,96$  ng/mL vs. *Abcc6*<sup>-/-</sup>  $88,81 \pm 12,82$  ng/mL; s. Abb. 21C). Die Pcsk9-Konzentration im Serum der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse verglichen mit den gleichaltrigen Wt-Mäusen zeigte zwar ebenfalls einen geringen Anstieg, jedoch war der Unterschied statistisch nicht signifikant (s. Abb. 21C).

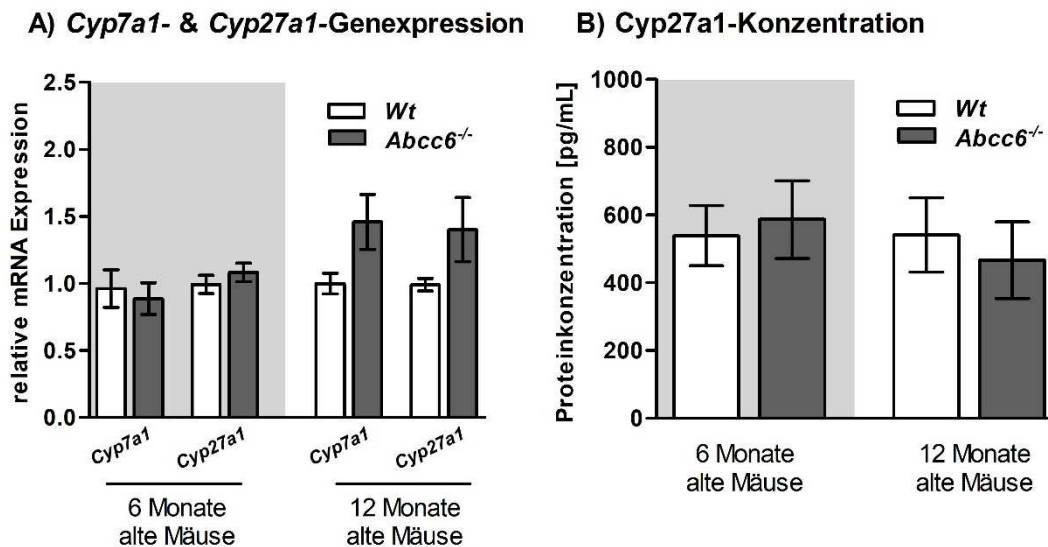


**Abbildung 21: Genexpressionsanalyse von Pcsk9 und des LDL-Rezeptors im Lebergewebe und Bestimmung der Pcsk9-Proteinkonzentration im Serum 6 Monate und 12 Monate alter Mäuse.** A) Relative Quantifizierung der mRNA-Expression der Gene Proproteinconvertase Subtilisin/Kexin Typ 9 (*Pcsk9*) und Low-density lipoprotein-Rezeptor (*Ldlr*) im Lebergewebe 6 Monate und 12 Monate alter Wt- und *Abcc6*-defizienter Mäuse (6 Monate alte Mäuse: Wt: n = 22, *Abcc6*<sup>-/-</sup>: n = 25; 12 Monate alte Mäuse: Wt: n = 37, *Abcc6*<sup>-/-</sup>: n = 39). B) Relative Quantifizierung der mRNA-Expression der *Ldlr* im weißen Fett- und Nierengewebe 6 Monate und 12 Monate alter Wt- und *Abcc6*-defizienter Mäuse (6 Monate alte Mäuse: Wt: Fett n = 22, Niere n = 25, *Abcc6*<sup>-/-</sup>: Fett n = 18, Niere n = 23; 12 Monate alte Mäuse: Wt: Fett n = 33, Niere n = 34, *Abcc6*<sup>-/-</sup>: Fett n = 38, Niere n = 42). Die ermittelten normalisierten relativen Genexpressionen der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden auf die Genexpressionen aller Wt-Mäuse normiert, welche auf 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM). C) Die Pcsk9-Proteinkonzentration wurde im Serum von 6 Monate und 12 Monate alten Wt- und *Abcc6*-defizienten Mäusen (6 Monate alte Mäuse: Wt: n = 27, *Abcc6*<sup>-/-</sup>: n = 21; 12 Monate alte Mäuse: Wt: n = 35, *Abcc6*<sup>-/-</sup>: n = 31) mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte einer Doppelbestimmung und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Die statistischen Signifikanzen wurden für A) und B) mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test berechnet (\* = p ≤ 0,05).

### 3.3.11 Gen- und Proteinexpression von Cytochromen zur Untersuchung der hepatischen Gallensäuresynthese

Der hepatische Cholesterinabbau in Gallensäuren ist ein entscheidender Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Cholesterinhomöostase [167]. Die wasserlöslichen Gallensäuren können dann über die Galle ausgeschieden werden. Die Enzyme der Cytochrom P450-Familie, wie das mikrosomale *Cyp7a1* und das mitochondriale *Cyp27a1*, haben in dem Degradationsprozess von Cholesterin eine entscheidende Funktion [145]. Aus diesem

Grund wurde die Genexpression beider Enzyme im Lebergewebe von 6 Monate und 12 Monate alten Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse relativ quantifiziert (s. Abb. 22A). Von allen Oxysterinen des murinen Plasmas hat das 27-Hydroxycholesterin die höchste Konzentration und wird durch das Cyp27a1-Enzym synthetisiert [150]. Aus diesem Grund wurde ebenfalls die Cyp27a1-Proteinkonzentration in den Leberhomogenaten der 6 Monate und 12 Monate alten Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse bestimmt (s. Abb. 22B).



**Abbildung 22: Genexpressionsanalyse von Cyp7a1 und Cyp27a1 sowie Bestimmung der Cyp27a1-Proteinkonzentration im Lebergewebe 6 Monate und 12 Monate alter Mäuse.** A) Relative Quantifizierung der mRNA-Expression der Gene Cholesterin-7 $\alpha$ -Monooxygenase (*Cyp7a1*) und Sterol-26-Hydroxylase (*Cyp27a1*) im Lebergewebe 6 Monate und 12 Monate alter Wt- und *Abcc6*-defizienter Mäuse (6 Monate alte Mäuse: Wt: n = 22, *Abcc6*<sup>-/-</sup>: n = 25; 12 Monate alte Mäuse: Wt: n = 37, *Abcc6*<sup>-/-</sup>: n = 39). Die ermittelten normalisierten relativen Genexpressionen der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden auf die Genexpressionen aller Wt-Mäuse normiert, welche auf 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM). B) Die Cyp27a1-Proteinkonzentration wurde im Lebergewebe von 6 Monate und 12 Monate alten Wt- und *Abcc6*-defizienten Mäusen (6 Monate alte Mäuse: Wt: n = 13, *Abcc6*<sup>-/-</sup>: n = 13; 12 Monate alte Mäuse: Wt: n = 18, *Abcc6*<sup>-/-</sup>: n = 12) mittels ELISA bestimmt. Es wurden 2,5  $\mu$ g Gesamtprotein jeder Probe zur Quantifizierung des Cyp27a1-Gehaltes eingesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte einer Doppelbestimmung und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Die statistischen Signifikanzen wurden für A) und B) mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test berechnet.

Eine geringfügige, statistisch nicht signifikante Suppression der Genexpression von *Cyp7a1* (0,9-fach  $\pm$  0,12) sowie keine Veränderung der Genexpression von *Cyp27a1* (1,0-fach  $\pm$  0,12) wurden für das Lebergewebe der 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den gleichaltrigen Wt-Mäusen ermittelt (s. Abb. 22A). Die Analyse der Genexpression von *Cyp7a1* und von *Cyp27a1* im Lebergewebe der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse verglichen mit den Wt-Mäusen ergab eine statistisch nicht signifikante 1,5-fache  $\pm$  0,21 und 1,4-fache  $\pm$  0,24 Erhöhung (s. Abb. 22A). Die Bestimmung der Cyp27a1-Protein-



konzentration des Lebergewebes zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen, sowohl für die 6 Monate als auch für die 12 Monate alten Mäuse (s. Abb. 22B).

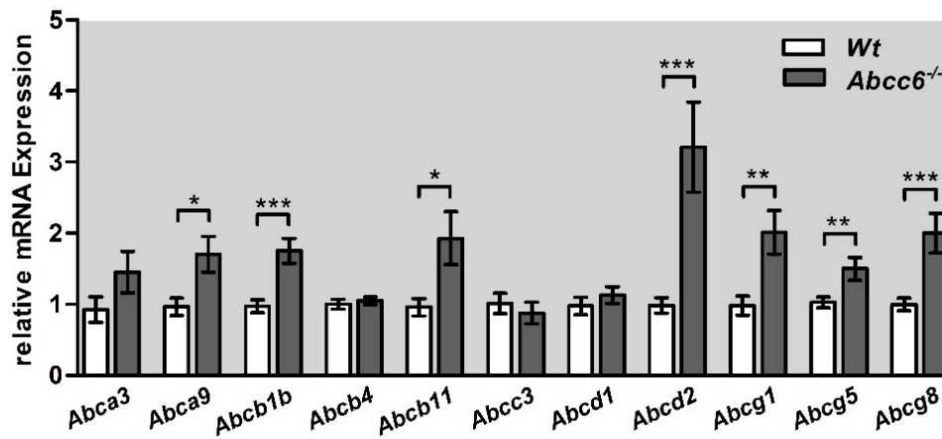
### **3.4 Genexpressionsanalyse von ABC-Transportern im metabolisch aktiven Gewebe *Abcc6*-defizienter Mäuse**

ABC-Transporter sind essentiell für den Ablauf vieler physiologischer Prozesse. Mutationen in den kodierenden Sequenzen dieser Transporter führen zu einer Reihe von Erkrankungen beim Menschen wie z.B. dem Dubin-Johnson Syndrom (ABCC2) und der X-Adrenoleukodystrophy (ABCD1) [211]. Allerdings konnte eine kompensatorische Expression des *Abcc3*-Gens bei einem *Abcc2*-Funktionsverlust im Tiermodell nachgewiesen werden [212]. Ebenso konnte eine Überexpression des *Abcd2*-Gens in *Abcd1*<sup>-/-</sup>-Mäusen gezeigt werden [213]. Um zu prüfen, ob ein Funktionsverlust von *Abcc6* durch andere ABC-Transporter ausgeglichen werden kann, wurden die Expressionsraten von ausgewählten ABC-Transportern der Unterfamilien a, b, c, d und g in metabolisch aktiven Gewebe (Leber, Niere, weißes Fettgewebe) mit Hilfe der qPCR analysiert. Die Leber und die Niere sind zudem die Gewebe, die primär das *Abcc6*-Protein exprimieren [37,38]. Die Expressionsraten der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden auf die Expressionsraten aller Wt-Mäuse bezogen, deren Messwerte auf eins normiert wurden (s. Abb. 23 und 24).

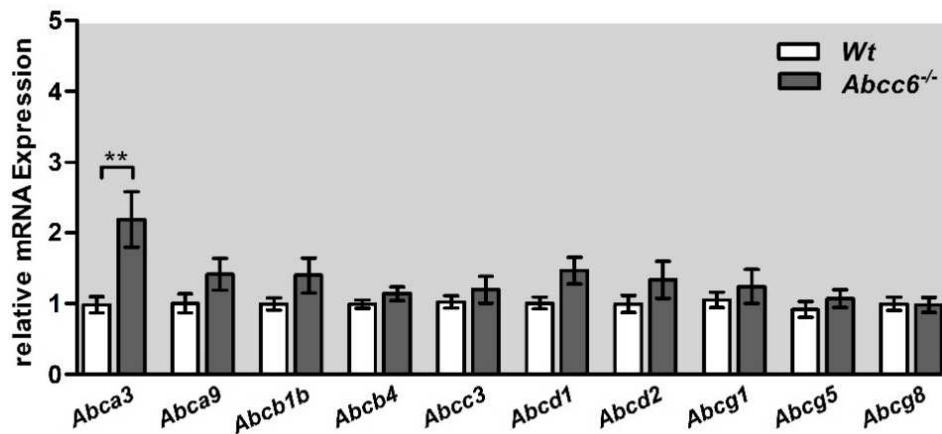
#### **3.4.1 Genexpressionsanalyse der ABC-Transporter im Leber-, Nieren- und Fettgewebe 6 Monate alter *Abcc6*-defizienter Mäuse**

Die größten Expressionsunterschiede der ABC-Transporter zwischen *Abcc6*<sup>-/-</sup>- und Wt-Mäusen wurden im Lebergewebe festgestellt (s. Abb. 23A). Das Lebergewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigte im Vergleich zu den Wt-Mäusen eine 1,5-fache  $\pm 0,29$  nicht signifikante Erhöhung der *Abca3*- sowie eine signifikante 1,7-fache  $\pm 0,25$  Erhöhung der *Abca9*-Genexpression. Die relative Expression von *Abcb1b* (1,8-fach  $\pm 0,17$ ) und *Abcb11* (1,9-fach  $\pm 0,37$ ) waren im Lebergewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse verglichen mit den Wt-Mäusen signifikant höher (s. Abb. 23A).

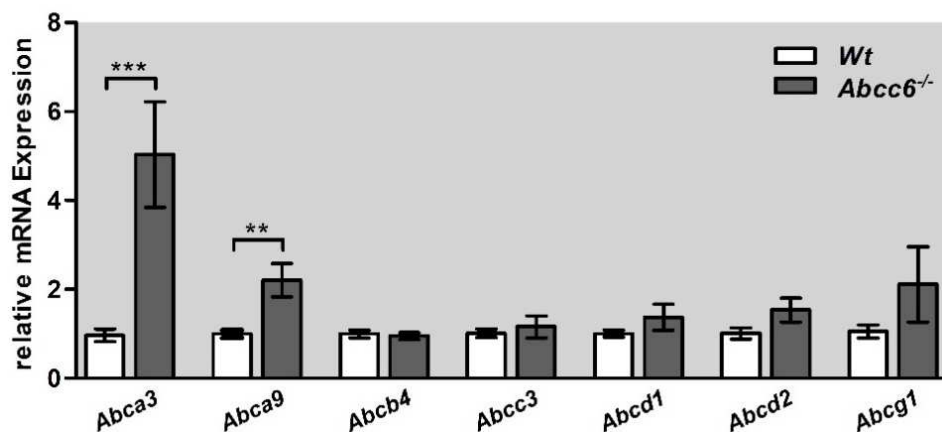
## A) Lebergewebe



## B) Nierengewebe



## C) Fettgewebe



**Abbildung 23: Genexpressionsanalyse der ABC-Transporter in metabolisch aktiven Geweben 6 Monate alter Mäuse.** Relative Quantifizierung der mRNA-Expression ausgewählter Adenosintriphosphat-Bindungskassetten (ABC)-Transporter: *Abca3*, *Abca6*, *Abca9*, *Abcb1b*, *Abcb4*, *Abcb11*, *Abcc3*, *Abcd1*, *Abcd2*, *Abcg1*, *Abcg5* und *Abcg8* im A) Lebergewebe B) Nierengewebe und C) weißem Fettgewebe 6 Monate alter Wt- und *Abcc6*-defizienter Mäuse (Wt: Leber n=22, Niere n=23, Fett n=18; *Abcc6*<sup>-/-</sup>: Leber n=25, Niere n=25, Fett n=21). Die ermittelten normalisierten relativen Genexpressionen der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden auf die Genexpressionen aller Wt-Mäuse normiert, welche auf 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Die statistischen Signifikanzen wurden mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test berechnet (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ).

Es konnte dagegen keine signifikante Änderung der Genexpression von *Abcb4*, *Abcc3* und *Abcd1* im Lebergewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse in Bezug auf die Wt-Mäuse festgestellt werden (s. Abb. 23A). Verglichen mit den Wt-Mäusen war allerdings die relative Genexpression von *Abcd2* signifikant um das 3,2-Fache  $\pm 0,63$  erhöht im Lebergewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse. Es wurden zudem signifikante Expressionssteigerungen aller untersuchten Mitglieder der Abcg-Unterfamilie im Lebergewebe der *Abcc6*-defizienten Mäuse beobachtet (s. Abb. 23A). Die relative Genexpression von *Abcg1* und *Abcg8* war um das 2,0-Fache  $\pm 0,30$  und von *Abcg5* um das 1,5-Fache  $\pm 0,16$  im Lebergewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den Wt-Mäusen induziert (s. Abb. 23A).

Im Nieren- und weißen Fettgewebe führte der *Knockout* von *Abcc6* zu einer signifikanten veränderten Expressionsrate von *Abca3* (s. Abb. 23B und 23C). Das Ausmaß der Induktion war im Nierengewebe mit einer 2,2-fachen  $\pm 0,38$  Erhöhung geringer als die Expressionssteigerung im weißen Fettgewebe mit einer 5,0-fachen  $\pm 1,19$  Erhöhung (s. Abb. 23B und 23C). Zudem konnte eine statistisch nicht signifikante Genexpressionssteigerung der Transporter *Abca9* und *Abc1b1* um das 1,4-Fache  $\pm 0,23$  im Nierengewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse detektiert werden (s. Abb. 23B). *Abcb4* und *Abcc3* wiesen keine unterschiedliche Expression im Nierengewebe der 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den gleichaltrigen Wt-Mäusen auf. Es wurde im Nierengewebe der 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse für *Abcd1* und *Abcd2* eine nicht signifikante Expressionssteigerung um das 1,5-Fache  $\pm 0,19$  und um das 1,3-Fache  $\pm 0,26$  bezogen auf die Wt-Mäuse detektiert. Die Genexpressionsrate von *Abcg1*, *Abcg5* und *Abcg8* war im Nierengewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse verglichen mit den Wt-Mäusen geringfügig und statistisch nicht signifikant induziert (s. Abb. 23B).

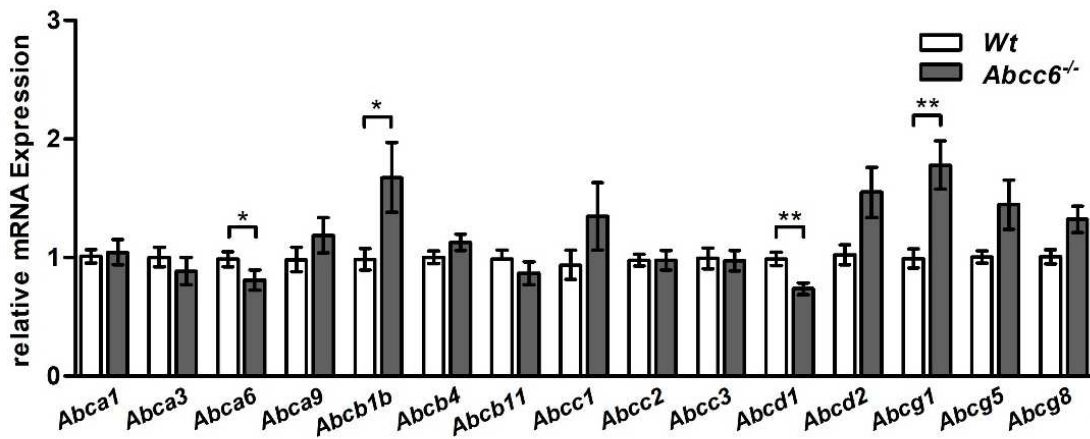
Es wurde eine Steigerung der Genexpression um das 2,2-Fache  $\pm 0,37$  für den *Abca9*-Transporter im Fettgewebe der *Abcc6-Knockout*-Mäuse detektiert. Die relative Expression der Transporter *Abcd1* und *Abcd2* war ebenfalls im Fettgewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse in Bezug auf die Wt-Mäuse 1,4-fach  $\pm 0,29$  und 1,5-fach  $\pm 0,27$  erhöht (s. Abb. 23C). Es konnte darüber hinaus auch eine 2,1-fache  $\pm 0,85$  Expressionssteigerung des *Abcg1*-Gens im Fettgewebe der 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse gezeigt werden. Diese Erhöhungen waren allerdings statistisch nicht signifikant. Es konnten keine weiteren signifikanten Veränderungen im Genexpressionsniveau anderer ABC-Transporter des weißen Fettgewebes der 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Verhältnis zu den Wt-Mäusen beobachtet werden (s. Abbildung 23C).

### 3.4.2 Genexpressionsanalyse der ABC-Transporter im Leber-, Nieren- und Fettgewebe 12 Monate alter *Abcc6*-defizienter Mäuse

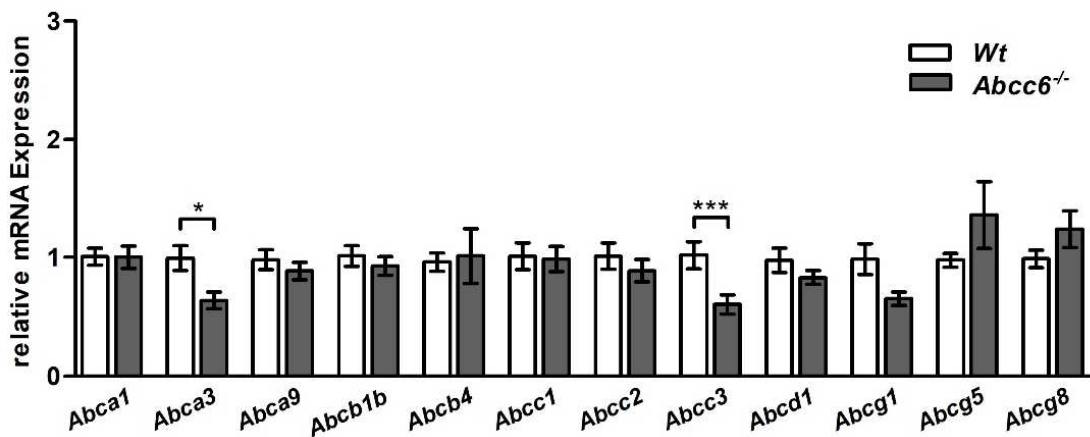
Es konnten keine statistisch signifikanten Regulationen in der Genexpression von Mitgliedern der ABC-Transporterfamilien a und c (*Abca1*, *Abca3*, *Abca9*, *Abcc1*, *Abcc2* und *Abcc3*), ausgenommen von *Abca6*, im Lebergewebe der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen verglichen mit den Wt-Mäusen beobachtet werden (s. Abb. 24A). Die *Abca6*-Genexpression war dagegen um das 0,8-Fache  $\pm 0,09$  im Lebergewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse supprimiert. Für das *Abcb1b*-Gen konnte eine signifikante 1,7-fache  $\pm 0,30$  Zunahme der Expressionsrate im Lebergewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse in Bezug auf die Wt-Mäuse nachgewiesen werden. Die Transporter *Abcb4* und *Abcb11* wiesen allerdings hinsichtlich der Genexpression im Lebergewebe der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse bezogen auf die Wt-Mäuse keine signifikante Veränderung auf (s. Abb. 24A). Die *Abcd1* mRNA-Expression im Lebergewebe der *Abcc6*-defizienten Mäuse war im Vergleich zu den Wt-Mäusen auf das 0,7-Fache  $\pm 0,05$  erniedrigt. Es kam hingegen zu einer statistisch nicht signifikanten 1,5-fachen  $\pm 0,21$  Expressionssteigerung des *Abcd2*-Transporters. Ebenso wurde eine höhere Transkriptionsrate von *Abcg1*, *Abcg5* und *Abcg8* im Lebergewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse festgestellt. Die *Abcg1*-Expression war signifikant in *Abcc6*-defizienten Mäusen in Bezug auf die Wt-Mäuse um das 1,8-Fache  $\pm 0,20$  gesteigert (s. Abb. 24A).

Es wurden insgesamt verminderte Expressionsraten für die meisten ABC-Transporter im Nierengewebe der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse verglichen mit den Wt-Mäusen detektiert (s. Abb. 24B). Eine signifikante Genexpressionsreduktion der Transporter *Abca3* (0,6-fach  $\pm 0,07$ ) und *Abcc3* (0,6-fach  $\pm 0,08$ ) konnte im Nierengewebe *Abcc6*-defizienter Mäuse in Bezug auf die Wt-Mäuse gezeigt werden (s. Abb. 24B). Die mRNA-Expression von *Abca1* und *Abcc1* war hingegen in den *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen auf dem gleichen Expressionsniveau wie in den Wt-Mäusen. Allerdings war die relative Expression von *Abca9* (0,9-fach  $\pm 0,07$ ), *Abcb1b* (0,9-fach  $\pm 0,08$ ), *Abcc2* (0,9-fach  $\pm 0,09$ ), *Abcd1* (0,8-fach  $\pm 0,06$ ) und *Abcg1* (0,7-fach  $\pm 0,06$ ) im Nierengewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den Wt-Mäusen geringfügig, aber statistisch nicht signifikant, supprimiert. Das Nierengewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse wies eine nicht signifikante Erhöhung der *Abcg5*-Expression (1,4-fach  $\pm 0,29$ ) und der *Abcg8*-Expression (1,2-fach  $\pm 0,16$ ) auf (s. Abb. 24B).

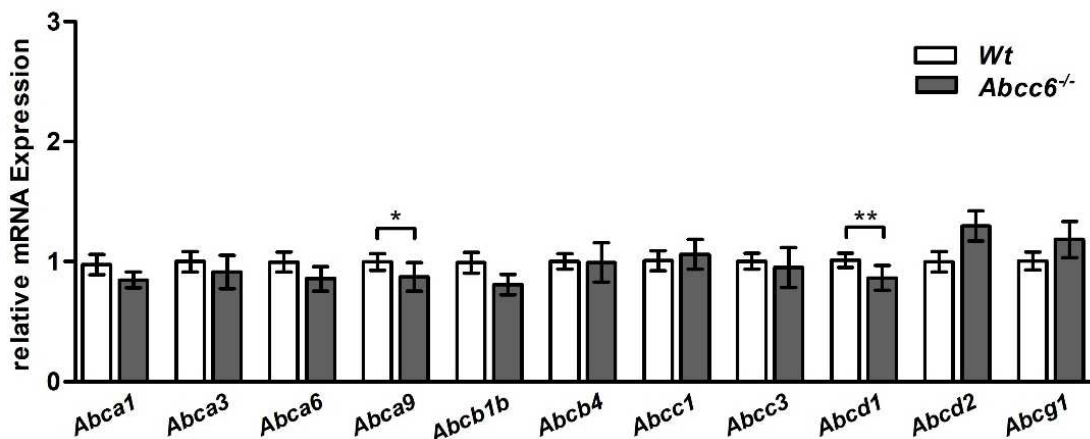
## A) Lebergewebe



## B) Nierengewebe



## C) Fettgewebe



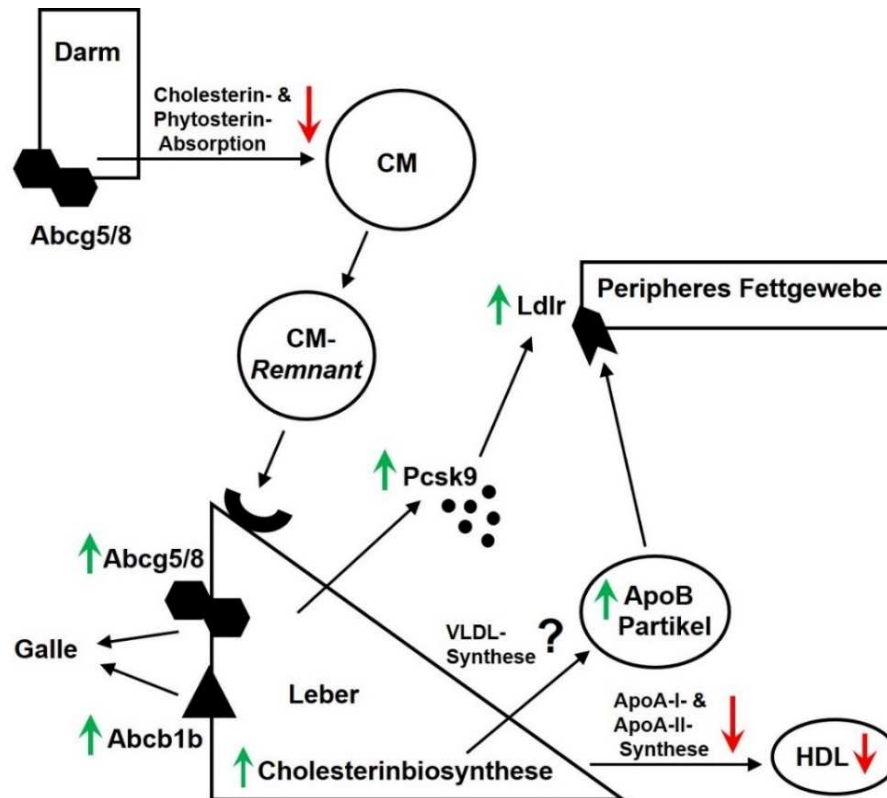
**Abbildung 24: Genexpressionsanalyse der ABC-Transporter in metabolisch aktiven Gewebe 12 Monate alter Mäuse.** Relative Quantifizierung der mRNA-Expression ausgewählter Adenosintriphosphat-Bindungskassetten (ABC)-Transporter: *Abca1*, *Abca3*, *Abca6*, *Abca9*, *Abcb1b*, *Abcb4*, *Abcb11*, *Abcc1*, *Abcc2*, *Abcc3*, *Abcd1*, *Abcd2*, *Abcg1*, *Abcg5* und *Abcg8* im A) Lebergewebe B) Nierengewebe und C) weißem Fettgewebe 6 Monate alter Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup> Mäuse (Wt: Leber n = 37, Niere n = 34, Fett n = 33; *Abcc6*<sup>-/-</sup>: Leber n = 39, Niere n = 42, Fett n = 38). Die ermittelten normalisierten relativen Genexpressionen der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden auf die Genexpressionen aller Wt-Mäuse normiert, welche auf 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Die statistischen Signifikanzen wurden mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test berechnet (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ).

Die relative Expressionsrate von *Abca1* (0,8-fach  $\pm$  0,07), *Abca3* (0,9-fach  $\pm$  0,14), *Abca6* (0,9-fach  $\pm$  0,10), und *Abcb1b* (0,8-fach  $\pm$  0,09) des weißen Fettgewebes war in den 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen verglichen mit den Wt-Mäusen geringer (s. Abb. 24C), wenngleich auch nicht statistisch signifikant. Darüber hinaus war die relative Genexpression der ABC-Transporter *Abca9* und *Abcd1* im Fettgewebe der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse signifikant auf das 0,9-Fache ( $\pm$  0,09) reduziert (s. Abb. 24C). Im Gegensatz dazu hatte die Transkriprate von *Abcb4*, *Abcc1* und *Abcc3* im Fettgewebe der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse das gleiche Expressionsniveau wie die gleichaltrigen Wt-Mäuse. Für die relative mRNA-Expression von *Abcd2* (1,3-fach  $\pm$  0,13) und *Abcg1* (1,2-fach  $\pm$  0,15) konnte im Fettgewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse bezogen auf die Wt-Mäuse eine leichte, aber statistisch nicht signifikante, Induktion beobachtet werden (s. Abb. 24C).

## 4 Diskussion

Das Hauptmerkmal von PXE ist eine progressive Kalzifizierung der elastischen Fasern des Bindegewebes [1,12]. PXE wird durch Mutationen im *ABCC6*-Gen verursacht, die zu einem Funktionsverlust des Proteins führen [9–11]. Die metabolische Hypothese nimmt an, dass das Fehlen des *ABCC6*-Transporters am Hauptexpressionsort, der Leber, zu einem Mangel unbekannter Faktoren in der Zirkulation führt und so das Auftreten der Mineralisierungen und anderer Symptome in der Peripherie zur Folge hat [36,214]. Darüber hinaus korrelieren Polymorphismen im *ABCC6*-Gen auch mit veränderten Serumlipiden und einem erhöhten Risiko für koronare Erkrankungen [64,67,68,215]. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Analyse der Auswirkungen einer *Abcc6*-Defizienz auf die Cholesterinhomöostase mit Hilfe des etablierten Mausmodells von Gorgels *et al.* [39]. Um den progressiven Verlauf von PXE abbilden zu können, wurden die Stoffwechselveränderungen von 6 Monate und 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu den entsprechend gleichaltrigen Wt-Mäusen analysiert. Diese Mäuse sind vom Alter her vergleichbar mit PXE-Patienten eines frühen und eines fortgeschrittenen Krankheitsstadiums, respektive 6 Monate und 12 Monate alte *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst der PXE-ähnliche Phänotyp der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse über den Nachweis deutlicher Kalzifizierungen im Bindegewebe der Vibrissenkapseln 12 Monate alter *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Hilfe einer Alizarin-Rot-Färbung bestätigt. Die Mineralisierungen der Vibrissenkapseln werden im Mausmodell von Klement *et al.* als Kalzifizierungsmarker herangezogen [58,216]. Dieser Marker kann somit für das Mausmodell, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, genutzt werden. Die Genotypbestimmung und die *Western-Blot*-Analyse bestätigten den Gensequenzverlust von *Abcc6* und konsequenterweise die fehlende Expression des Proteins im Lebergewebe. Im Leberhomogenat der Wt-Maus wurde eine Proteinbande bei ca. 165 kDa detektiert, die der erwarteten Größe des *Abcc6*-Proteins entspricht [217]. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass PXE mit einer Veränderung des Lipidstoffwechsels einhergeht. Insbesondere der HDL-Stoffwechsel war in den *Abcc6*-defizienten Mäusen von den Veränderungen betroffen. Hier liegt vermutlich eine gestörte HDL-Biogenese vor, da das erste Mal gezeigt werden konnte, dass es im *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mausmodell zu einem reduzierten ApoA-I- und ApoA-II-Serumgehalt kommt. Dementsprechend war auch das HDL-Cholesterin im Serum der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse verglichen mit den Wt-Mäusen vermindert. Außerdem konnte in dieser Arbeit erstmals auf eine geringere Phytosterin- und Cholesterinabsorption sowie eine veränderte hepatische Cholesterinbiosynthese als Folge einer *Abcc6*-Defizienz indirekt geschlossen werden. Diese Beobachtungen waren bereits in den 6 Monate alten Mäusen zu sehen und stellten sich mit zunehmendem Alter der Mäuse von 12 Monaten stärker

ausgeprägt dar. Die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit anhand des *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mausmodells erzielt wurden, sind in Abbildung 25 zusammengefasst.



**Abbildung 25: Hypothetisches Modell der Alteration der Cholesterinhomöostase bei einer *Abcc6*-Defizienz im Mausmodell.** Die Phytosterin und Cholesterinabsorption war in den *Abcc6*-defizienten Mäusen erniedrigt. Absorbierte Lipide werden über Chylomikronen (CM) und CM-Remnant-Partikel receptorvermittelt in die Leber aufgenommen. Die aufgenommen Lipide können direkt oder nach Metabolisierung zu Gallensäuren mittels Adenosintriphosphat-Bindungskassetten (ABC)-Transporter in den Gallengang ausgeschieden werden. Im Lebergewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse konnte eine erhöhte *Abcg5/8*- und *Abcb1*-Genexpression festgestellt werden. Außerdem wurde indirekt gezeigt, dass die Aktivität der Cholesterinbiosynthese erhöht war, was auf eine gesteigerte *Very-low-density lipoproteins* (VLDL)-Synthese und-Sekretion hindeutet. Zudem konnte eine erhöhte Apolipoprotein (Apo)B-Konzentration sowie eine Zunahme des Pcsk9-Gehaltes im Serum der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse festgestellt werden. Pcsk9 wiederum reguliert vornehmlich die hepatische *Low-density lipoprotein*-Rezeptor (Ldlr)-Dichte, aber auch die der Peripherie. Darüber hinaus war die Konzentration von ApoA-I und ApoA-II, die für die Bildung der *High-density lipoproteins* (HDL)-Partikel essentiell sind, reduziert. Konsequenterweise konnte eine Abnahme des HDL-Cholesterins im Serum der *Abcc6*-defizienten Mäuse beobachtet werden.



#### 4.1 Erniedrigung der Serumlipide bei einer *Abcc6*-Defizienz

Die Studien der Arbeitsgruppe von Gorgels *et al.* zeigten eine altersabhängige Erniedrigung des Gesamtcholesterins und des HDL-Cholesterins im Plasma der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse. Dabei wiesen die Plasmalipide der *Abcc6*-defizienten Mäuse mit einem Alter von 2,5 Monaten noch keine Veränderungen auf, sondern erst mit einem Alter von 8 Monaten [39]. Eine Erniedrigung des Gesamtcholesterins von ca. 10 % und des HDL-Cholesterins um etwa 20 % ließen sich in der hier vorliegenden Arbeit schon in den 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse nachweisen. Mit höherem Alter von 12 Monaten hatten die Reduktionen im Serum der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse weiter zugenommen. Die Konzentrationsabnahme des Gesamtcholesterins betrug ca. 20 % und des HDL-Cholesterins ca. 25 % in den 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu den entsprechenden Wt-Mäusen. Auf den Menschen bezogen konnten verschiedene Sequenzvariationen bekannter Gene wie *LIPC* und *ABCA1*, aber auch Sequenzvariationen des *ABCC6*-Gens, die sowohl PXE verursachen können als auch nicht krankheitsauslösend sind, mit einem erniedrigten HDL-Cholesterin assoziiert werden [64,65,67,68,218]. Dies könnte in direktem Zusammenhang mit dem erhöhten kardiovaskulären Risiko bei PXE-Patienten stehen.

Pflanzensterine können im Gegensatz zu Cholesterin nur über die Nahrung aufgenommen und nicht von Säugetierzellen synthetisiert werden [219]. Die Serumkonzentration von Phytosterinen korreliert positiv mit der absoluten Rate der Cholesterinabsorption aus der Nahrung und dem HDL-Cholesterin, sowie negativ mit der Cholesterinbiosynthese [198,201,202,220]. Im Blut werden freie und veresterte Phytosterine daher vornehmlich über HDL-Partikel transportiert [200]. Im Serum der 6 Monate und 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurde neben einer reduzierten Konzentration an Gesamt- und HDL-Cholesterin, auch eine erniedrigte Konzentration der Phytosterine, Brassicasterin, Campesterin, Sitosterin und Stigmasterin, nachgewiesen. Diese Ergebnisse lassen eine verminderte Cholesterin- und Pflanzensterinabsorption bei einer *Abcc6*-Defizienz vermuten. Obwohl der Transporter NPC111, exponiert auf der Enterozytenmembran, Cholesterin und Phytosterine gleichermaßen aufnimmt, kommen nur zwischen 3-10 % der Pflanzensterine aus der Nahrung (Campesterin > Sitosterin > Stigmasterin) im Blutkreislauf an [221,222], im Vergleich dazu aber ca. 50-60 % des Nahrungscholesterins [223,224]. Verantwortlich für die indirekte Beeinflussung der Absorption ist das funktionale Heterodimer der ABC-Transporter ABCG5 und ABCG8 durch eine Exkretion der Pflanzensterine. Dieses Transporterdimer ist Bestandteil der apikalen Zellmembran von Enterozyten und Hepatozyten und sekretiert dort Sterine zurück in das Darmlumen oder in die Galle [161,163,165,225]. Ein Ausfall

dieses Transporterdimers führt zur Phytosterolämie, einer exzessiven Akkumulation der pflanzlichen Sterine im Blut [226,227]. Eine Überexpression der humanen ABCG5- und ABCG8-Transporter in transgenen Mäusen bewirkte verglichen mit den Wt-Mäusen eine Reduktion der Serumphytosterine um mehr als 50 %, eine erhöhte Ausscheidungsrate neutraler Sterine in die Galle sowie einen Anstieg der Cholesterinbiosynthese [164]. Die Gallenflüssigkeit dieser transgenen Tiere war getrübt und enthielt große Mengen eines amorphen Materials [164], was auf eine Gallensteinbildung hindeuten könnte [228,229]. Eine gesteigerte hepatische ABCG5/ABCG8-Genexpression hatte allerdings keinen Einfluss auf die Plasmalipidkonzentrationen [230]. Die Abnahme der Phytosterinkonzentrationen im Serum der *Abcc6*-defizienten Mäuse fiel im Vergleich zu den Literaturdaten wesentlich geringer aus und lag etwa bei 20-30 %. Allerdings wurde ebenfalls eine Induktion der hepatischen *Abcg5*- und *Abcg8*-Genexpression in dieser Arbeit für 6 Monate und für 12 Monate alte *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse detektiert. Möglicherweise ist der *Abcc6*-Transporter auch mit verantwortlich für eine funktionale Lipidabsorption, da das *Abcc6*-Protein auch im Magen und in den verschiedenen Darmabschnitten, vor allem dem Duodenum und Jejunum, von Maus und Mensch exprimiert wird. Diese Darmabschnitte sind primär für die Lipidabsorption, und besonders für die Cholesterinabsorption, verantwortlich [38,231–235]. Zusätzlich haben Hosen *et al.* anhand einer *in-silico*-Studie zur Aufklärung des bisher unbekannten Substrates von ABCC6 mittels molekularer *Docking*-Analyse eine Liste mit den theoretisch wahrscheinlichsten physiologischen Substraten von ABCC6 erstellt. Hierbei kommen vor allem Lipid- und Gallensäureverbindungen in Betracht. Unter den Kandidaten finden sich Phytosterine, auf Platz 3 Brassicasterin, auf Platz 41 Sitosterin und auf Platz 48 Stigmasterin [17]. Durch die hohe strukturelle Ähnlichkeit der pflanzlichen Sterine mit dem Cholesterin konkurrieren diese zum einen um die Aufnahme in die Enterozyten [223,236] und zum anderen um die Veresterung durch das Enzym SOAT [237]. Es wäre deshalb denkbar, dass Phytosterine nur ein Nebensubstrat des *Abcc6*-Transporters darstellen, welche strukturell ähnlich dem eigentlichen Substrat sind. Laut der Studie von Hosen *et al.* sind auch verschiedene Vitamin D-Hormone wie die Provitamine 7-Dehydrocholesterol, Ergosterin und Vitamin D3 oder die Zwischenstufe 25-Hydroxyvitamin D2 mögliche Substratkandidaten für den ABCC6-Transporter [17]. Sowohl eine Überdosierung, als auch ein Mangel der fettlöslichen Vitamin D-Hormone scheinen bei der Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen und von ektopischen Kalzifizierungen kritische Faktoren zu sein [238–243]. Hinzukommend konnten im *Dyscalc1*-Mausmodell, wobei es sich bei dem *Dyscalc1*-Gen um das als *Abcc6* beschriebene Gen handelt, erhöhte Expressionen des Vitamin D-Rezeptors festgestellt werden [244–246]. Geht man von einer Veränderung der Lipidabsorption bei PXE aus, könnten auch andere fettlösliche Nährstoffe neben den

Phytosterinen und Vitamin D-Hormonen betroffen sein, wie beispielsweise das Vitamin K. Einige Studien postulieren, dass Vitamin K eine große Rolle in der Pathogenese von PXE spielt [247,248]. Vanakker *et al.* wiesen eine reduzierte Vitamin K-Konzentration im Serum von PXE-Patienten nach. Vitamin K dient als Ko-Faktor für die Gamma-Carboxylierung von Kalzifizierungs-inhibitoren, wie dem Matrix-Gla-Protein [45,249]. Der postulierte indirekte inhibitorische Effekt von Vitamin K auf die Kalzifizierungen im murinen *Abcc6-Knockout*-Modell konnte allerdings nicht bestätigt werden, unerheblich ob Vitamin K als Nahrungszusatz oder intravenös supplementiert wurde [250–252].

Ein Marker der Lipidperoxidation zur Beurteilung des oxidativen Stresses und zur Prognose von Atherosklerose ist die Konzentrationsbestimmung von oxLDL-Cholesterin im Serum oder Plasma [253–255]. Überraschenderweise wurden im Serum der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse erniedrigte oxLDL-Cholesterinwerte detektiert, obwohl PXE mit einem erhöhten oxidativen Stress einhergeht [256–259]. Die oxLDL-Partikel korrelieren stark mit anderen Serumparametern, wie dem Gehalt an LDL-Cholesterin und der ApoB<sub>100</sub>-Konzentration [260,261]. In der Literatur wird daher die Frage diskutiert, ob eine Kombination aus diesen Parametern eine bessere Vorhersage über die Entwicklung von atherosklerotischen Erkrankungen zulässt [253,262]. Außerdem hängt die Konzentration des oxLDL-Cholesterins nicht nur vom oxidativen Stressstatus ab, sondern auch vom Gehalt des LDL-Cholesterins bzw. der Anzahl der LDL-Partikel, da diese als Substrat für die Lipidperoxidation dienen [253]. Im Falle der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse war das LDL-Cholesterin ebenfalls reduziert und damit kann, trotz geringerer oxLDL-Konzentration, ein erhöhter oxidativer Stress in diesen Mäusen nicht ausgeschlossen werden. Die Leber einer Maus hat generell eine 40-fach höhere LDL-Cholesterin-*Clearance* als ein Mensch [80,263,264], so dass das LDL-Cholesterin im Plasma der Maus stark vermindert ist und das HDL-Cholesterin die primäre Lipidfraktion darstellt. Dieser Untersuchungspunkt ist somit schwer vergleichbar mit dem humanen System [264]. Aus diesem Grund werden ergänzend zur Analyse des Cholesterinstoffwechsels spezielle *Knockout*-Modelle verwendet, wie beispielsweise das *Ldlr*<sup>-/-</sup>- oder das *ApoE*<sup>-/-</sup>-Modell [142,265]. Ein Vergleich zwischen 6 Monate und 12 Monate alten Mäusen zeigte, dass mit zunehmenden Alter, unabhängig vom Genotyp, die Menge an oxLDL-Cholesterin ansteigt. Somit ist es wahrscheinlich, dass die Zunahme des oxidativen Stresses und damit eine fortschreitende Lipidperoxidation nicht nur Merkmale im Zusammenhang mit einer Erkrankung darstellen, sondern natürliche Alterserscheinungen sind [266,267].

## 4.2 Erhöhung der hepatischen Cholesterinbiosynthese bei einer *Abcc6*-Defizienz

Die erniedrigten Cholesterinwerte im Serum der *Abcc6*-defizienten Mäuse können durch eine veränderte Absorptionsleistung, aber auch durch eine veränderte Biosyntheserate von Cholesterin zustande kommen. Die Veränderungen der Cholesterinbiosynthese wurden in dieser Arbeit unter Verwendung der qPCR-Technik im Lebergewebe der Mäuse untersucht, da die Leber ca. 40 % der Gesamtsyntheseleistung an Cholesterin im murinen Organismus übernimmt [268]. Das geschwindigkeitsbestimmende Enzym dieses Stoffwechselweges ist die HMGCR, welche transkriptionalen als auch post-transkriptionalen Regulierungen unterliegt [85,264,269]. Die 6 Monate und 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen eine nicht signifikante Erhöhung der relativen *Hmgcr*-Expression auf. Zudem war die relative Expressionsrate der *Lss* in den 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu zeigte sich die Expressionsrate der *Fdft1* im Lebergewebe sowie die *Hmgcr*-Genexpression im weißen Fettgewebe in den 12 Monate alten *Abcc6*-defizienten Mäusen signifikant erniedrigt. Neben der Leber hat auch das Fettgewebe eine regulatorische Rolle in der Cholesterinhomöostase des Körpers, da es den größten Speicher an Cholesterinestern und Triglyzeriden darstellt [270]. Zudem handelt es sich hierbei um ein endokrines Gewebe, welches metabolisch aktiv ist und über Hormone Einfluss auf andere Gewebe nimmt [271]. Es gibt eine Kommunikationsachse zwischen Leber und Fettgewebe zur Steuerung des Lipidmetabolismus über verschiedene parakrine Faktoren aus der Familie der fibroblastischen Wachstumsfaktoren [272,273]. So könnte hier die Cholesterinbiosynthese in der Leber erhöht sein, im peripheren Fettgewebe allerdings nicht. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu den Daten von Zellkulturexperimenten mit dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten und gesunden Probanden. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten als peripherer Zellverband eine erhöhte HMGCR-Expression sowie eine gesteigerte HMGCR-Aktivität aufwiesen [274].

Guo *et al.* zeigten einen präventiven Effekt von hohen Dosen Artovastatin, einem kompetitivem HMGCR-Hemmer, auf die Entwicklung von Mineralisierungen im Bindegewebe der Vibrissenkapseln von *Abcc6*-defizienten Mäusen, jedoch nicht in den anderen Geweben [69]. Wie die morphologischen Veränderungen der elastischen Fasern und damit einhergehenden Kalzifizierungen der extrahepatischen Gewebe mit der Cholesterinbiosynthese zusammenhängen, kann nur vermutet werden. Zur Veränderung dieser Bindegewebsfasern gehört eine verstärkte Expression von Proteinen wie Elastin, Vitronektin, Fibronektin und anderen Proteinen der Extrazellulären Matrix, die eine hohe Affinität für Calcium haben [2,4,51,53]. Dies kann somit zur Kalzifizierung führen, trotz

eines normalen Calcium-Phosphat-Haushaltes bei PXE-Patienten und im *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Tiermodell [58,275,276]. Die Mineralisierungen der elastischen Fasern bewirken anschließend deren Fragmentierung, was wiederum eine Kalzifizierung begünstigt [1–3]. Statine könnten durch Inhibition der HMGCR und des damit verbundenen Stoffwechselweges zu einer reduzierten Prenylierung des kleinen G-Proteins RhoA führen, welches den Knochenmorphogenetisches Protein 2 (BMP2)-Signalweg anschaltet und Mineralisierungen begünstigt [69,277]. Hosen *et al.* konnten in einer Tierstudie mit *Abcc6*-defizienten Mäusen zeigen, dass der BMP2-Signalweg, aber auch der Transformierende Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF $\beta$ )-Weg an den Orten aktiv ist, die von Kalzifizierungen betroffen sind, nämlich den Vibrissenkapseln und den Augen. Ebenfalls wurde in dieser Studie nachgewiesen, dass diese Signalwege in humanen Fibroblasten von PXE-Patienten *in vitro* hochreguliert sind [278]. Die SMAD-Proteine leiten die extrazellulären Signale der TGF $\beta$ -Familie, wobei die BMPs zu einer Untergruppe der TGF $\beta$ -Familie gehören, weiter in den Zellkern und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Genexpression von Komponenten der Extrazellulären Matrix, unter anderem der Kollagene [279]. Das Mitglied TGF $\beta$ 1 erhöht nicht nur die Kollagen-, sondern auch die Elastinsynthese [280]. Für die komplette Signalkaskade des TGF $\beta$ 1 zur Hochregulierung der Elastinexpression sind weitere Proteine nötig, wie das geranylierte Ras-Protein [281]. Daher kann die Elastinproduktion auch durch Inhibition von Farnesyltransferasen und Geranylgeranyltransferasen unterbunden werden [281–283]. Statine und Bisphosphonate wirken indirekt inhibierend auf den TGF $\beta$ -Weg, indem sie die HMGCR oder die FDPS hemmen und somit auch die Geranylierung und Farnesylierung von Proteinen reduzieren [284]. Bisphosphonate stellen eine andere Stoffklasse dar, die in die Cholesterinbiosynthese eingreifen unter anderem durch Hemmung der FDPS. Mineralisierungen im *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mausmodell konnten durch Gabe von Bisphosphonaten, wie Etidronat und Alendronat, präventiv verhindert werden [285–287]. Im murinen Modell wurde in der Leber und Niere von *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen eine verstärkte Aktivität der BMP2-Kaskade nachgewiesen. Allerdings wurden keine Veränderungen im TGF $\beta$ -Signalpfad festgestellt [288]. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit der Beobachtung, dass PXE-Patienten in der Regel keine Kalzifizierungen in der Leber aufweisen und in der Niere die Blutgefäße von Calciumablagerungen betroffen sind, anstatt des Parenchyms [30,41]. Lin *et al.* konnten in einer 3D-Kultur mit humanen glatten Muskelzellen der koronaren Gefäßmuskulatur zeigen, dass ein aktiver Ras-Extrazelluläre Signalregulierte Kinase (ERK)1/2-Signalweg auch hier zu einer erhöhten Elastinsynthese führt [289]. Das Anschalten dieses Signalpfades führt laut Boussac *et al.* zu einer geringeren *ABCC6*-Expression in HepG2-Zellen. Die Repression der *ABCC6*-Genexpression kann durch den Transkriptionsfaktor HNF4 $\alpha$  aufgehoben werden, da dieser den Ras-ERK1/2-Weg

inaktiviert und eine Bindestelle im *ABCC6*-Promotor besitzt [71,72]. Zusammenfassend könnte bei einer *Abcc6*-Defizienz eine erhöhte Cholesterinbiosynthese zu einer verstärkten Produktion von prenylierten Proteinen führen. Diese Proteine könnten über BMP2- und TGF $\beta$ -Signalwege einen Einfluss auf die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix besitzen und damit die Entwicklung der PXE charakteristischen Symptome begünstigen.

Bis heute wurden Veränderungen des Cholesterinstatus und im Besonderen des HDL-Cholesterins bei PXE-Patienten noch nicht systematisch untersucht [42]. Allerdings wird eine frühzeitige und regelmäßige Analyse des Serumlipidprofils für PXE-Patienten empfohlen [290]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden, unterstützend zu den Daten aus der qPCR-Analyse, die Cholesterinvorläufermoleküle im murinen Serum quantifiziert welche einen Rückschluss auf die Cholesterinbiosyntheserate ermöglichen [201,202,220]. Die absolute Desmosterinkonzentration war zwar im Serum der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse beider Altersklassen verglichen mit den entsprechenden Wt-Mäusen unverändert. Allerdings war das Verhältnis von Desmosterin- zum Gesamtcholesteringehalt in den 6 Monate und 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen statistisch signifikant um ca. 25 % höher als in den entsprechenden Wt-Mäusen. Die absolute Serumkonzentration an Lanosterin sowie das Verhältnis der Lanosterin- zur Gesamtcholesterinkonzentration war in den 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu den Wt-Mäusen signifikant reduziert. Das Vorläufermolekül Lanosterin induziert die Degradation der HMGCR [291–294] und daher würde eine erhöhte Lanosterinkonzentration eine weitere Cholesterinbiosynthese inhibieren. Aus diesem Grund ist eine gesteigerte hepatische Cholesterinbiosynthese doch wahrscheinlich in den *Abcc6*-defizienten Mäusen. Im Einklang damit stehen die hier erniedrigten Phytosterinkonzentrationen im murinen Serum, da diese eine Cholesterinbiosynthese induzieren und Phytosterine und Cholesterinvorläufermoleküle in der Regel invers miteinander korrelieren [201].

#### **4.3 Reduktion der HDL-Biogenese und Erhöhung der VLDL-Synthese bei einer *Abcc6*-Defizienz**

Lipoproteine wie HDL-, VLDL- und LDL-Partikel benötigen für ihre Lipidtransportfunktion im Blut auch Proteinkomponenten, die Apolipoproteine, welche lipidkomplexierende Eigenschaften zur Lipoproteinstabilisierung besitzen [128]. Die Apolipoproteine vermitteln zudem die zelluläre Aufnahme von Lipoproteinkomplexen und dienen als Lipidakzeptoren und Ko-Faktoren von Enzymen [81,129]. Zur Beurteilung der Ursache für das reduzierte Gesamtcholesterin und HDL-Cholesterin wurden die Apolipoproteine auf Genexpressions- und auf Proteinebene in den *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen untersucht. Die Apolipoproteine ApoA-I,

ApoA-II, ApoA-IV und ApoC-I, die zum größten Teil von der Leber gebildet werden, lagen im Serum der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse beider Altersgruppen im Vergleich zu den entsprechenden Wt-Mäusen um bis zu 36 % reduziert vor. Die zwei Hauptstrukturelemente der HDL-Partikel sind ApoA-I und ApoA-II [132]. Der HDL-Metabolismus wird durch die hepatische und intestinale Synthese von ApoA-I initiiert. Daher ist ApoA-I in Wechselwirkung mit ABCA1 für die Biogenese der HDL-Partikel zuständig, indem es als Lipidakzeptor für überschüssiges Cholesterin dient [295]. Dies stellt den Startpunkt des reversen Cholesterintransportes von der Peripherie zur Leber für eine Cholesterinexkretion dar [100]. Viele Studien haben herausgearbeitet, dass ein geringes HDL-Cholesterin ein entscheidender und vom LDL-Cholesterin unabhängiger Faktor ist, der im Menschen koronare Gefäßerkrankungen begünstigt [296]. Ein weiteres HDL-assoziiertes Protein ist ApoA-IV, welches wie ApoA-I und ApoA-II *in vivo* antioxidativ wirkt [297]. Der Effekt von HDL-Partikeln als Antioxidans resultiert durch die Aufnahme von Produkten der Lipidperoxidation aus oxLDL-Partikeln [298]. Das Protein ApoC-I reguliert im Zusammenhang mit dem HDL-Stoffwechsel die Aktivitäten verschiedener Proteine. Es ist unter anderem zuständig für die Aktivierung der LCAT und die Inhibition der LIPC [204]. Außerdem hat ApoC-I einen wichtigen Einfluss auf die ApoB-vermittelte VLDL-Aufnahme in die Leber. Eine Überexpression von humanem *ApoC1* im murinen Tiermodell führte zu einer enormen Erhöhung des Serumcholesterins und der Triglyzeride durch Akkumulation von VLDL-Partikeln [299]. Überraschenderweise ging ein *Apoc1*-*Knockout* in der Maus nicht mit einem hypolipidämischen Phänotyp einher, sondern mit normalen Lipidkonzentrationen des Serums unter Gabe von Standardfutter [300]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass es bei einem *Abcc6*-Funktionsverlust im Mausmodell zu einer Abnahme der ApoA-I-, ApoA-II-, ApoA-IV- und ApoC-I-Serumkonzentration kommt. Diese Beobachtung könnte den reduzierten HDL-Cholesteringehalt der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse erklären. Diese Ergebnisse geben gleichzeitig auch einen Hinweis auf eine vermutlich verminderte HDL-Biogenese und somit auf einen reduzierten reversen Cholesterintransport. Diese Vermutung wird durch die unveränderte *Abca1*-Genexpressionsrate in den metabolisch aktiven Geweben, Leber-, Niere und Fettgewebe, der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse gestützt. Außerdem könnte die Reduktion des HDL-Cholesterins um etwa 20 % bis 25 % sowie die Abnahme des ApoA-I-Proteins von ca. 18 % im Serum der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse für eine Induktion der Expression des *Abcg1*-Transporters im Lebergewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse verantwortlich sein um einen reversen Cholesterintransport zu gewährleisten. Patienten, die an der Tangier-Krankheit leiden aufgrund einer Mutation in der *ABCA1*-Gensequenz, weisen eine minimale HDL-Cholesterinkonzentration im Blut auf [301]. Parallel konnte eine Zunahme der Expression von *ABCG1* in ABCA1-defizienten Makrophagen nachgewiesen

werden [302]. Der Transporter ABCG1 ist, anders als ABCA1 nicht für die initiale HDL-Biogenese verantwortlich, sondern für die weitere Beladung der bereits entstandenen und lipidierten ApoA-I-HDL-Partikel [119]. Im Menschen und in der Maus wird ein Mangel an HDL-Cholesterin in der Regel durch eine Konzentrationsreduktion der Apolipoproteine ApoA-I und ApoA-II verursacht. Allerdings kann einer geringe HDL-Cholesterinkonzentration auch auf eine verminderte LCAT-Aktivität aufgrund einer gestörten Reifung der HDL-Partikel zurückgeführt werden [303,304]. Das ApoA-I ist genau wie das ApoC-I außerdem ein LCAT-Aktivator [204]. Die ApoA-I-Konzentration im Serum der 6 Monate und 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse war verglichen mit den Wt-Mäusen um 18 % erniedrigt. Die Abnahme der ApoC-I-Serumkonzentration betrug in den 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen 17 % und in den 12 Monate *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen sogar 25 %. Die Reifung der HDL-Partikel scheint in den *Abcc6*-defizienten Mäusen dennoch nicht gestört zu sein, da im Serum der 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse eine geringe, um nur 5 %, erniedrigte Lcat-Aktivität und in den 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen eine unveränderte Lcat-Aktivität im Vergleich zu den entsprechenden Wt-Mäusen beobachtet wurde. Ein weiteres wichtiges Enzym ist die Lipase der Hepatozyten, LIPC, die ebenfalls mit der HDL-Cholesterinkonzentration durch die Wechselwirkung mit verschiedenen ApoA-Proteinen im Zusammenhang steht. Eine erhöhte LIPC-Aktivität reduziert das Serumlevel an HDL-Cholesterin [305]. Die relative *Lipc*-Expression war in dieser Arbeit im Lebergewebe der 6 Monate und 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen, 1,3-fach und 1,1-fach, erhöht. Dies könnte somit auf eine erhöhte Aktivität hinweisen, die zu einem schnelleren ApoA-I-Katabolismus führt [306]. Eine reduzierte ApoA-II-Serumkonzentration verstärkt laut Weng *et al.* diesen Effekt, da ApoA-II ein Inhibitor der LIPC ist [307]. Es konnte ebenso nachgewiesen werden, dass bereits die Genexpression von *Lipc* im Lebergewebe von transgenen Mäusen intrazellulär eine ApoA-I-Synthese und -Sekretion stört, ohne dass *Lipc* als Enzym aktiv ist [308]. Zusammengefasst lassen die moderat erhöhte *Lipc*-Genexpression des Lebergewebes und die erniedrigte ApoA-II-Konzentration im Serum der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse einen schnelleren ApoA-I-Katabolismus vermuten, der wiederum zu einem verminderten HDL-Cholesterin führen könnte.

Ein weiterer Risikofaktor für die Entwicklung von Gefäßerkrankungen neben einem erniedrigten HDL-Cholesterin im Blut ist eine erhöhte LDL-Cholesterinkonzentration [103]. Unter anderem führen Mutationen im *LDLR*-, *PCSK9*- und *ApoB*-Gen zu einem erhöhten LDL-Cholesteringehalt im Blut [105,309,310]. Das ApoB ist ein Strukturprotein der CM, VLDL-, IDL- und LDL-Partikel im Blut und reguliert die Synthese und die Sekretion dieser triglyzeridreichen Lipoproteine. Die CM werden von den Enterozyten des Darms sekretiert und enthalten Nahrungslipide sowie die ApoB-Variante ApoB<sub>48</sub> [311]. Die VLDL-Partikel werden von der Leber synthetisiert und sind mit ApoB<sub>100</sub> ausgestattet, um endogenes



Cholesterin und Triglyzeride zu den peripheren Geweben zu transportieren. Im Blut von Menschen enthalten VLDL-Partikel nur ApoB<sub>100</sub>, während die VLDL-Partikel von Mäusen sowohl ApoB<sub>100</sub> als auch ApoB<sub>48</sub> enthalten können [311]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die ApoB-Konzentration im Serum von *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen erhöht vorlag. Allerdings konnte nicht zwischen den Varianten ApoB<sub>100</sub> und ApoB<sub>48</sub> unterschieden werden, sodass offen bleibt, ob diese Erhöhung aus einer gesteigerten Lipidaufnahme im Darm oder aus einer induzierten VLDL-Sekretion der Leber resultiert. Die erniedrigten Phytosterinkonzentrationen im Serum der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse sprechen gegen eine verstärkte CM-Bildung und konsequenterweise gegen eine erhöhte Lipidaufnahme im Darm. Zudem deutet eine in dieser Arbeit vermutlich induzierte hepatische Cholesterinbiosynthese auf eine gesteigerte VLDL-Synthese hin.

Die Triglyzeride der CM, VLDL-, IDL und LDL-Partikel werden durch die LPL hydrolysiert und die freien Fettsäuren können so ins Gewebe aufgenommen werden, insbesondere vom Fettgewebe zur Speicherung [100]. Die Hydrolase LPL wird vornehmlich von den Adipozyten exprimiert und ins Blut sekretiert, aber unter bestimmten physiologischen Bedingungen, wie der Wirkung des Tumornekrosefaktors  $\alpha$  oder aber von Transkriptionsfaktoren der PPAR-Familie, auch von der adulten Leber [209]. Die Mechanismen und die Funktion der Expressionssteigerung der LPL in der Leber sind noch weitestgehend unbekannt [209]. Jedoch würde eine erhöhte hepatische LPL-Aktivität massiv freie Fettsäuren generieren, die in die Hepatozyten aufgenommen werden und für eine  $\beta$ -Oxidation in den Peroxisomen sorgen [312]. Im murinen System konnte beobachtet werden, dass eine hepatische Überexpression der *Lpl* zu einem erhöhten Triglyzeridgehalt der Leber führt [313]. Zur Bestimmung der LPL-Aktivität wird diese in der Regel im Postheparin-Plasma analysiert, da das Enzym durch Heparansulfate an die Oberfläche von Endothelzellen gebunden ist, um dort katalytisch aktiv zu sein [314]. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass auch die Bestimmung der LPL-Konzentration ohne vorhergehende Heparininjektion klinisch relevant ist und positiv mit dem HDL-Cholesteringehalt korreliert [315]. In dieser Arbeit konnte ein reduziertes HDL-Serumcholesterin und eine hepatische 2,5-fache und 3,4-fache *Lpl*-Expressionssteigerung in den 6 Monate und 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen sowie eine 1,4-fache Erhöhung der *Lpl*-Expression im Fettgewebe der 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse festgestellt werden. Trotz dieser Beobachtungen konnte in den *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen beider Altersklassen kein Unterschied in der präheparinen *Lpl*-Konzentration des Serums detektiert werden. Das deutet auf einen unveränderten Triglyzeridmetabolismus in den *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen hin.

Ein zellulärer Cholesterinmangel bewirkt über den Transkriptionsfaktor Srebf2 auf der einen Seite die Aktivierung der Cholesterinbiosynthese und auf der anderen Seite eine

verstärkte Cholesterinaufnahme über LDLR, um den Mangel schnellstmöglich auszugleichen [78]. Diese Mechanismen laufen nicht ohne Regulationen ab, beispielsweise indem Enzyme für die Synthese von Cholesterin durch die eigenen Stoffwechselprodukte gehemmt werden und der LDLR mit Hilfe von PCSK9 abgebaut werden kann [292]. Das Enzym PCSK9 wird primär in der Leber synthetisiert [111] und anschließend ins Blut sekretiert, wo es im besonderen Maße für die Degradation des LDLR auf der Oberfläche von Hepatozyten, aber auch anderen Zellen verantwortlich ist [110,316]. Eine Überexpression von *Pcsk9* führte im Mausmodell zu einer Erniedrigung von hepatischem *LDLR* und zu einer Hypercholesterinämie [317]. Ein *Pcsk9-Knockout* im Mausmodell führte hingegen zu einer Akkumulation von LDLR auf der Hepatozytenoberfläche führte und dementsprechend zu einer reduzierten Cholesterinkonzentration im Blut [318]. Das PCSK9 muss katalytisch aktiviert werden für eine korrekte Faltung und Sekretion [111]. Dieser Prozess ist allerdings nicht notwendig um den LDLR *in vivo* abzubauen [316] und letztendlich den Katabolismus von ApoB-LDL-Partikeln zu beeinflussen [319]. In den 6 Monate und 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde keine veränderte Expressionsrate des *Pcsk9*-Gens im Lebergewebe im Vergleich zu den Wt-Mäusen festgestellt. Allerdings konnte eine erhöhte Serumkonzentration von Pcsk9 in den 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen verglichen mit den gleichaltrigen Wt-Mäusen nachgewiesen werden sowie eine altersabhängige Zunahme des Pcsk9-Gehaltes im Serum der Wt-Mäuse. In einer Studie von Liu *et al.* wurde beobachtet, dass die Serumkonzentration an Pcsk9 in *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit dem Alter ansteigt [320]. Im gesunden Menschen nimmt die PCSK9-Konzentration im Blut ebenfalls mit dem Alter zu [321–323]. Der Transkriptionsfaktor SREBP2 aktiviert die Genexpression von *LDLR* und aller Gene, die für die Cholesterinbiosynthese notwendig sind, aber auch die von *PCSK9* [171,324]. Dies steigert zum einen die Cholesterinbiosynthese und eine VLDL-Sekretion der Leber, verhindert zum anderen gleichzeitig eine hepatische Aufnahme der VLDL-Partikel über den LDLR, um eine ausgewogene Cholesterinhomöostase der Leber und der peripheren Gewebe zu gewährleisten [316]. Die 2,4-fach erhöhte *Ldlr*-Genexpression des weißen Fettgewebes in den 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen könnte daher auf eine verstärkte Aufnahme der VLDL-Partikel hinweisen. Zusammengefasst deuten der erhöhte ApoB- und Pcsk9-Gehalt des Serums auf eine mögliche Induktion der hepatischen VLDL-Synthese in den *Abcc6*-defizienten Mäusen hin, obwohl die Gesamtcholesterinkonzentration in diesen Mäusen erniedrigt war.

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit eine PCR-Array-Analyse durchgeführt, um Expressionsveränderungen von 84 Genen des Lipoproteinsignal- und des

Cholesterinstoffwechsels in den metabolisch aktiven Geweben: Leber, Niere und weißes Fettgewebe, von 12 Monate alten Wt- und *Abcc6*-defizienten Mäusen zu untersuchen. Eine unabhängige Verifikation von PCR-Array-Analysen durch sekundäre Untersuchungsmethoden ist unerlässlich [203], da in dieser Analyse einige Ergebnisse des PCR-Arrays nahe der Detektionsgrenze waren. Die Nutzung der qPCR-Technik zur Bestätigung von Array-Daten ist eine gängige Methode [203,325,326]. Die *Ankra2*-Genexpression war in der Array-Analyse im Lebergewebe der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse stark induziert. Diese Expressionssteigerung konnte in der qPCR-Analyse bestätigt werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die relative *Ankra2*-Expression, sowohl in der Array- als auch in der qPCR-Untersuchung, im weißen Fettgewebe der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse verglichen mit den Wt-Mäusen erniedrigt war. Ankra2 interagiert mit dem Megalin-Protein, einem Mitglied der LDL-Rezeptorfamilie [327,328] und wird ubiquitär im Körper exprimiert [328]. Die genaue Funktion des Proteins ist bislang unbekannt [329,330]. Allerdings wird in der Literatur diskutiert, ob Ankra2 eine generelle Rolle in der zellulären Physiologie spielt [328] und dort als Adapter für Membranproteine über Protein-Protein-Wechselwirkungen fungiert, um weitere modulierende Signalproteine zur Membran zu leiten [328,329] und/oder als Regulator der Genexpression im Zellkern dient [329]. Die Rolle von Ankra2 in den *Abcc6*-defizienten Mäusen lässt sich demnach nicht aufklären. Es kann daher nur ein Zusammenhang mit der Aufnahme von LDL-Partikeln und folglich mit der hepatischen VLDL-Sekretion bei einer *Abcc6*-Defizienz vermutet werden.

#### **4.4 Erhöhte Genexpressionsrate von ABC-Transportern zur Cholesterinausscheidung bei einer *Abcc6*-Defizienz**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde überprüft, ob eine *Abcc6*-Defizienz eine kompensatorische Genexpression von ABC-Transportern, die am Lipid- und Gallensäurestoffwechsel beteiligt sind, in den metabolisch aktiven Geweben Leber, Niere und dem weißen Fettgewebe [271,331] von 6 Monate und 12 Monate alten Mäusen zur Folge hat. Das Leber- und Nierengewebe stellen die Hauptexpressionsorte von *Abcc6* dar [37]. In einer Studie von Li *et al.* wurde eine ca. 6,5-fache Erhöhung der *Abca4*-Genexpression im Lebergewebe von 1 Monate alten *Abcc6*-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wt-Mäusen beobachtet. Dies konnte aber nicht für andere Gewebe wie die Niere und das Auge bestätigt werden [332]. In dermalen Fibroblasten führte eine *ABCC6*-Defizienz zu einer kompensatorischen Hochregulation der Genexpression von den ABC-Transportern *ABCA6* und *ABCA9* sowie zu einer Expressionserniedrigung von *ABCA3* [43]. In dieser Arbeit konnte eine Zunahme der relativen Expression der Gene *Abca3* und *Abca9* im Leber-, im Nieren- und im weißen Fettgewebe der 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse verglichen mit den Wt-Mäusen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu

wurde in diesen Geweben der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse eine Expressionsabnahme dieser Gene festgestellt. Auch die Expression von *Abca6* war im Lebergewebe der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse reduziert. Das *Abca3*-Protein ist vornehmlich in der Membran von *Lamellar Bodies* der Lunge lokalisiert, dem Speicherorganell für *Surfactant* (*surface activ agent*). Das *Surfactant* ist ein Gemisch aus Phospholipiden, neutralen Lipiden, Cholesterin und hydrophoben Proteinen. In der Lunge ist der ABCA3-Transporter für das Benetzen des Epithels mit *Surfactant* verantwortlich, um einen alveolaren Gasaustausch zu gewährleisten [333]. Der *Abca3*-Transporter konnte allerdings auch in der Niere und Leber von Mäusen detektiert werden [333,334]. Die Funktion dieses Proteins innerhalb des Lipidtransportes der extrapulmonaren Gewebe und Organe ist zurzeit noch unklar. Allerdings wurde eine Expressionsabnahme des relativen *Abca3*-Transkripts in Mäusen nach einem ischämischen Reperfusionsschaden der Niere nachgewiesen [335]. Der *Abca9*-Transporter besitzt eine hohe Sequenzhomologie mit dem *Abca6*-Transporter von 60 % und mit dem *Abca8*-Transporter von 72 % [336] und bildet zusammen mit *Abca5* und *Abca10* ein Gencluster der *Abca6-like* Transporter [337]. Eine erhöhte *Abca8*-Genexpressionrate ist assoziiert mit der Induktion des reversen Cholesterintransports [338].

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit eine relative Expressionssteigerung des *Abcd2*-Transporters um das 3,2-Fache im Lebergewebe der 6 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse beobachtet. Dies könnte im Zusammenhang mit der Cholesterinreduktion im Serum der *Abcc6*-defizienten Mäuse stehen und eine erhöhte Oxidation von langkettigen Fettsäuren zur Folge haben. Weinhofer *et al.* konnten zeigen, dass ein Cholesterinmangel in Fibroblasten und Monozyten zu einer Induktion der Expression des *ABCD2*-Gens führt [339]. Transporter der ABCD-Unterfamilie haben in der Zelle die Aufgabe langkettige Fettsäuren über die peroxisomale Membran zu transportieren, um in den Peroxisomen mittels  $\beta$ -Oxidation degradiert zu werden [340]. Dieser Abbau ist laut Mihalik *et al.* mit einer Erhöhung der Gallensäuresynthese assoziiert [341]. Zudem fand eine Metabolom-Studie von Rasmussen *et al.* im Lebergewebe von *Abcc6*-defizienten Mäusen eine Akkumulation von Pantothersäure (Vitamin B5) [217], welche für den Aufbau von Coenzym A (Co A) notwendig ist [342]. Co A dient wiederum als Kofaktor für viele Stoffwechselwege innerhalb des Lipidmetabolismus, wie der Cholesterin-, der Gallensäure-, der Fettsäuresynthese als auch der Fettsäure-Oxidation und der Lipolyse [343]. Eine erhöhte Konzentration der Co A-Vorstufe 3'-Dephosphocoenzym A und des Coenzym A selbst konnte ebenfalls in dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten nachgewiesen werden [274]. Generell wurden im Lebergewebe der 6 Monate und 12 Monate alten *Abcc6*-defizienten Mäuse im Vergleich zu den Wt-Mäusen eine höhere

Genexpression von Transportern festgestellt, die Phospholipide (*Abcb1b*), Cholesterin/Sterine (*Abcg1*, *Abcg5* und *Abcg8*) und Gallensäuren (*Abcb11*) über die *canaliculäre* Membran in die Galle schleusen. Diese Beobachtung könnte auf eine erhöhte Cholesterinexkretion hinweisen [344,345]. Für eine Ausscheidung des Cholesterins in die Galle benötigt das Transporterpaar *Abcg5* und *Abcg8* zusätzlich die Expression von *Abcb4* [344]. Die *Abcb4*-Genexpressionrate war allerdings in den *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen verglichen mit den Wt-Mäusen nicht verändert. Darüber hinaus wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Abnahme des prozentualen Lebergewichtes bezogen auf das Körpergewicht um 0,5 % in den 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen festgestellt. Eine Abnahme des prozentualen Lebergewichtes wurde bereits in der Literatur für verschiedene Mausmodelle, die durch eine erhöhte Cholesterinsekretion zur Gallensteinbildung neigen beschrieben. Sowohl unter Verabreichung einer Standard-, als auch einer lithogenen Diät konnte dieser Effekt nachgewiesen werden [228,346]. Die Plasmakonzentration des Gesamt-, des HDL- und des LDL-Cholesterins war, im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, in den zu Gallensteinen neigenden Mäusen jedoch tendenziell erhöht [228,346,347]. Die meisten Zelltypen sind in der Lage Triglyzeride und freie Fettsäuren zu verstoffwechseln, Cholesterin jedoch nicht. Eine Akkumulation von Cholesterin ist daher für diese Zellen toxisch. Daher muss überschüssiges Cholesterin über HDL-Partikel in die Leber zurücktransportiert werden [100], wo es direkt in die Galle oder nach der Umwandlung in wasserlösliche Gallensäuren exkretiert werden kann [145,146]. Die Umwandlung des Cholesterins in Gallensäure benötigt 17 verschiedene Enzyme der Cytochrom-P450-Familie, die Bestandteil verschiedener Stoffwechselwege sind. Viele dieser Enzyme werden primär in der Leber exprimiert [145]. Der klassische Weg generiert im ersten Reaktionsschritt 7 $\alpha$ -Hydroxycholesterin und wird von der mikrosomalen Cyp7a1 katalysiert. Der alternative Weg erzeugt extrahepatisch das 27-Hydroxycholesterin durch Hydroxylierung [148]. Diese Reaktion wird von der mitochondrialen Cyp27a1 ermöglicht, welche in nahezu allen Geweben vorkommt. Die Enzymaktivität von Cyp7a1 ist dagegen auf die Leber beschränkt [348]. In murinen *Knockout*-Studien von Ishibashi *et al.* und Schwarz *et al.* konnte festgestellt werden, dass *Cyp7a1*<sup>-/-</sup>-Mäuse aufgrund des Ausfalls der Leberfunktion postnatal sterben. Dies geht einher mit einer massiven Vitamin-defizienz, einer Lipidmalabsorption und einer 200-fachen Induktion der Cholesterin-biosynthese [142,349]. Ein *Cyp27a1-Knockout* in der Maus hat metabolisch geringere Auswirkungen als ein *Cyp7a1-Knockout*, jedoch ähnliche Ausprägungen. Die Gallensäuresynthese sowie die Cholesterinabsorption waren im *Cyp27a1*<sup>-/-</sup>-Mausmodell reduziert. Die Cholesterinbiosynthese sowie eine *Cyp7a1*-Genexpression, um den Mangel an Cyp27a1 zu kompensieren, waren in den *Cyp27a1*<sup>-/-</sup>-Mäusen jedoch induziert [350,351]. Auf eine

verminderte Lipidabsorption im Darm der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse kann nur indirekt durch die reduzierten Phytosterinkonzentrationen geschlossen werden. Zudem lassen die Ergebnisse dieser Arbeit eine erhöhte hepatische Cholesterinbiosynthese in den *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen vermuten. Im Lebergewebe der *Abcc6*-defizienten Mäuse konnte allerdings keine Suppression oder Induktion der Genexpressionsrate von *Cyp7a1* oder *Cyp27a1* detektiert werden. Zudem konnte auch keine veränderte hepatische *Cyp27a1*-Proteinkonzentration in den *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen nachgewiesen werden. In Zellkulturexperimenten mit dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten konnten jedoch erhöhte *Cyp27a1*-Expressionen festgestellt werden, sowohl auf Transkriptom- als auch auf Proteinebene. Dies könnte auf die gesteigerte Synthese von Cholesterin in den Hautzellen zurückzuführen sein [274]. Dem entgegen war die mRNA-Expression der ABC-Transporter, die für den Transport von Cholesterin/Sterinen, Gallensäuren und konjugierten Gallensäuren verantwortlich sind, *Abcb1b*, *Abcb11*, *Abcg5* und *Abcg8*, im Lebergewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse erhöht. Die *Abcc2*- und *Abcc3*-Transporter transportieren über die basolaterale Membran der Hepatozyten neben verschiedenen toxischen Stoffen auch Gallensäuren ins Blut [352,353]. Analog zu den Untersuchungen dieser Arbeit stellten Li *et al.* keine Regulationen der *Abcc*-Transporter im Lebergewebe von 1 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen fest [197]. Eine übermäßige Produktion an Gallensäuren führt mittels des Transkriptionsfaktors FXRα (*Nr1h4*) zu einer Erniedrigung des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms der Gallensäuresynthese, dem *Cyp7a1* [354,355]. Akkumulierte Gallensäuren inhibieren via FXRα die Transkription von *ApoA-I* [356], welches in den *Abcc6*-defizienten Mäusen verstärkt exprimiert wurde, jedoch als Protein vermindert im Serum dieser Mäuse vorlag. Ein Überschuss an zellulärem Cholesterin aktiviert dagegen den LXRα (*Nr1h3*), der die *Cyp7a1*-Expression induziert, zum Beispiel für eine Verstoffwechselung des akkumulierten Cholesterins [357,358]. LXRα reguliert auch die Expression anderer Gene wie der ABC-Transporter *Abca1*, *Abcg1*, *Abcg5* und *Abcg8*, die zum größten Teil verstärkt in den Lebergeweben der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse exprimiert wurden. Es konnte eine Expressionssteigerung der Transkriptionsfaktoren *Nr1h4* (FXR α) oder *Nr1h3* (LXR α) im Lebergewebe der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen gezeigt werden. In einer *in-vivo*-Studie von Inoue *et al.* wurde zudem demonstriert, dass das *Cyp27a1* ein Zielgen des Transkriptionsfaktors HNF4α ist [359], welches auch die Expression von *Abcc6* gewebsspezifisch moduliert [71]. Zusammengefasst kann daher vermutet werden, dass die Sekretion in die Galle in den *Abcc6*-defizienten Mäusen erhöht ist. Allerdings konnten hier vorerst keine direkten Hinweise auf eine induzierte Gallensäuresynthese gezeigt werden konnten.

## 4.5 Ausblick

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Zusammenhang zwischen PXE und Veränderungen im Cholesterinstoffwechsel bestätigt und vertieft werden. Um die Pathogenese von PXE aufzuklären und folglich eine mögliche Therapieform zu entwickeln, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

Das HDL-Cholesterin im Serum von Mäusen macht die größte Lipidfraktion aus [80] und es konnte in dieser Arbeit erneut gezeigt werden, dass das HDL-Cholesterin hier ab dem 6. Lebensmonat im Serum von *Abcc6*-defizienten Mäusen reduziert vorlag. Zusätzlich waren die ApoA-I- und ApoA-II-Konzentrationen, respektive um etwa 18 % und 36 %, im Blut der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse erniedrigt, was auf eine geringere Anzahl an HDL-Partikeln hindeutet [360]. Allerdings können beide Parameter alleine keinen genauen Einblick in die Funktionalität der HDL-Partikel geben [361]. Die Funktionalität könnte in einem Cholesterin-Efflux-Experiment überprüft werden um zu analysieren, ob die HDL-Partikel der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse die gleiche Kapazität und Funktionalität besitzen Cholesterin aus den extrahepatischen Geweben aufzunehmen wie die HDL-Partikel von Wt-Mäusen. Da PXE mit einem erhöhten oxidativen Stress im Zusammenhang steht [256–258], wäre es ratsam die anti-oxidative Wirkung der HDL-Partikeln auf die Lipidperoxidation von *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den Wt-Mäusen zu untersuchen.

Die Genexpressionsraten der Schlüsselenzyme der Cholesterinbiosynthese, die Quantifizierung der Cholesterinvorläuferkonzentrationen von Lanosterin und Desmosterin und der Phytosterine im murinen Serum und die Erhöhung der *Abcg5*- und *Abcg8*-Genexpression geben indirekt Hinweise darauf, dass die Syntheserate des Cholesterins im Lebergewebe der *Abcc6*-defizienten Mäusen erhöht ist. Eine ergänzende Analyse der Hmgcr-Aktivität im Lebergewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse würde genauere Aussagen über die Alteration der Cholesterinbiosynthese zulassen.

Die detektierte Expressionssteigerung der ABC-Transporter der Lipid- und Gallensäureexkretion, *Abcb1b*, *Abcb11*, *Abcg5* und *Abcg8* im Lebergewebe sowie die verminderte Phytosterinabsorption und der reduzierte Cholesteringehalt im Serum der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse beider Altersklassen weisen auf eine veränderte Gallensäuresynthese hin [164,362]. In diesem Zusammenhang sollte die Cyp7a1-Konzentration und dessen Aktivität im Lebergewebe untersucht werden, um einen möglichen Unterschied zwischen der Gallensäuresyntheserate zwischen Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen festzustellen. Das Enzym Cyp7a1 wird nur in der Leber synthetisiert und ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Gallensäuresynthese. Es hat somit einen Einfluss auf die Cholesterin- und Gallensäurehomöostase der Leber [363,364]. In dieser

Beziehung würde eine massenspektrometrische Analyse der Gallensäuren des Lebergewebes Aufschluss über die Zusammensetzung der Gallenflüssigkeit geben.

Die hepatische Funktion des Proteins Soat2 besteht in der Veresterung von freiem Cholesterin, um die entstandenen Cholesterinester zur VLDL-Synthese oder zur Speicherung in *Lipid-Droplets* zu nutzen [365]. In dieser Arbeit wurde eine erhöhte ApoB-Konzentration im Serum der 6 Monate und 12 Monate alten *Abcc6*-defizienten Mäuse beobachtet. Jedoch konnte nicht zwischen ApoB<sub>48</sub> und ApoB<sub>100</sub> unterschieden werden, sodass eine erhöhte VLDL-Produktion nur vermutet werden kann. Im Gegensatz dazu wurde eine signifikante Genexpressionsverringerung für *Soat2* im Lebergewebe der 12 Monate alten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse festgestellt. Hinweise auf eine Veränderung der *Lipid-Droplet*-Morphologie im Lebergewebe von *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden in ersten experimentellen Arbeiten im Rahmen der Masterarbeit von Kottkamp 2016 mittels histochemischer Färbung beobachtet [366]. Diese Unterschiede im Lebergewebe von *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen sollten in weiteren Arbeiten verifiziert werden, da HNF4α sowohl als Transkriptionsfaktor für *Abcc6* in der Leber fungiert, als auch ein *HNF4α-Knockout* im murinen Lebergewebe Einfluss auf die *Lipid-Droplet*-Morphologie besitzt. Hayhurst *et al.* konnte zeigen, dass das Volumen der hepatischen *Lipid-Droplets* im *HNF4α*<sup>-/-</sup>-Mausmodell massiv vergrößert war [73]. Zusätzlich wäre es wichtig, die Reduktion der *Soat2*-Expression auf Proteinebene z.B. über einen ELISA, ein Blot-Verfahren oder einer Aktivitätsbestimmung zu bestätigen.

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal aufgezeigt werden, dass die Pathophysiologie von PXE auch auf die Alteration der Cholesterinhomöostase zurückzuführen ist, insbesondere auf eine reduzierte HDL-Biogenese, eine verminderte Lipidabsorption und eine verstärkte Lipidsekretion. Nichtsdestotrotz bedarf es weiterer Untersuchungen, um den Zusammenhang zwischen PXE als Modellerkrankung für die Kalzifizierung des Elastins und der Veränderung des Cholesterinstoffwechsels im Detail verstehen zu können.



## 5 Materialien

Dieses Kapitel stellt die im Rahmen dieser Arbeit benutzten Materialien und Techniken zusammen. Bei Materialien und Geräten wird bei der Erstnennung der Hersteller mit Standort genannt, im Folgenden dann nur noch der Firmenname.

### 5.1 Chemikalien und Reagenzien

<i>AceGlow</i>	VWR International GmbH, Langenfelde
Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Alizarin Rot S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniak 32 %	Merck, Darmstadt
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroform	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chlorwasserstoff (HCL, 37 %)	Roth, Karlsruhe
dNTPs (100 mM)	Solis BioDyne, Tartu, EST
<i>Dulbeccos Phosphate Buffered Saline</i> (DPBS)	Thermo Fisher, Schwerte
Kryogenes Einbettmedium für Gefrierschnitte	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Ethanol, vergällt	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid, 1 %; 10 mg/mL	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Immersionsöl 518N	Zeiss, Peine
Isopropanol, (99,5 %, wasserfrei)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol ( <i>Ultra-UPLC grade</i> )	Roth, Karlsruhe
NP-40	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Oligo-dT-Primer	Biomers, Ulm
QIAzol Lyse Reagenz	Qiagen, Hilden
Proteaseinhibitor P2714	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinstandard ( <i>Micro Standard, liquid</i> )	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Roticlear</i>	Roth, Karlsruhe
<i>Rotimount</i> (aqua)	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Merck, Darmstadt
<i>Sample Reducing Agent</i> (10x)	Thermo Fisher, Schwerte
Sephadex-G50 Superfine	GE Healthcare, Solingen
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe

Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Wasser (HPLC-MS)	Thermo Fisher, Schwerte
Wasser (Aqua B. Braun)	Braun, Melsungen
Wasser für Injektionszwecke	Fresenius Kabi, Bad Homburg

## 5.2 Puffer und Lösungen

Alizarin Rot-Lösung (pH 6,4):	42 mM Alizarin Rot S 1 % Ammoniaklösung (0,28 %)
DNA-Ladepuffer:	0,05 % Bromphenolblau (m/v) 60 % Saccharose (m/v) 0,05 % Xylencyanol (m/v)
Lysepuffer (pH 7,8):	8,7 % Glycerin 0,5 mM EDTA (pH 8,0) 137,5 mM NaCl 1 % NP-40 1 % Protease Inhibitor (P2714) 50 mM Tris/HCL
TBE-Puffer (pH 8,3):	90 mM Borsäure 1 mM EDTA 100 mM Tris/HCL
TBS-T-Puffer (pH 7,6):	150 mM NaCl 50 mM Tris/HCL 0,1 % Tween 20
TE-Puffer (pH 7,5):	1 mM EDTA 10 mM Tris-HCL
Tris-Glycin-SDS-Laufpuffer (10x):	Thermo Fisher, Schwerte
Tris-Glycin-SDS-Probenpuffer (2x):	Thermo Fisher, Schwerte
Tris-Glycin-Transferpuffer (25x):	Thermo Fisher, Schwerte 10 % Methanol

### 5.3 Oligonukleotide

Alle Primer-Paare wurden intron-überspannend mit dem Programm Clone Manager Professional 9.0 designt. Die Qualität der Primer-Paare wurde *in silico* mit dem Programm *Primer-BLAST* von NCBI untersucht. Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers, Ulm bezogen und in einer Konzentration von 25 µM eingesetzt.

**Tabelle 7: Oligonukleotide zur Genotypbestimmung der Versuchstiere [1].**

Bezeichnung	Primersequenz 5' - 3'
<b>18F</b>	TGAATCTTCTGGGGGCCAG
<b>18R</b>	GTACCCTGGAGCAATCCACT
<b>T2</b>	ATGTGGAATGTGTGCGAGGCC

**Tabelle 8: Oligonukleotide zur relativen Quantifizierung der Expression von Genen mit Hilfe der qPCR; T<sub>AN</sub> = Annealing Temperatur; E = Effizienz.**

Gen	Primersequenz 5' - 3' forward reverse	T <sub>AN</sub>	E	Produkt- größe
<b>Hprt</b> Hypoxanthin- Phosphoribosyltransferase 1	GTTGGATACAGGCCAGAC GCCACAGGACTAGAACAC	59 °C	1,93	226 bp
<b>Gapdh</b> Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase	GCATCTTGGGCTACACTGAGG GGGTGGTCCAGGGTTTCTTAC	59 °C	1,92	211 bp
<b>β2m</b> Beta-2-Mikroglobulin	GGTCTTTCTGGTGCTTGTCTC GCAGGCGTATGTATCAGTCTC	59 °C	1,95	280 bp
<b>Eif3a</b> Eukaryotischer Translations- Initiationsfaktor 3, Untereinheit A	GAGTATCAGGAGCGAGTCAAG CCTCTCATCATCCCGAGTTTC	59 °C	1,82	255 bp
<b>Abca1</b> ATP-Bindungskassetten-Transporter, Unterfamilie A, Mitglied 1	ATAAAGCCATGCCGTCTG TGCTTGATCTGCCGTAAC	59 °C	1,92	238 bp
<b>Abca3</b> ATP-Bindungskassetten-Transporter, Unterfamilie A, Mitglied 3	CTCTTGTCTGTCTCCTATC GTCCTTATTGCCCACTTG	59 °C	2,00	423 bp
<b>Abca6</b> ATP-Bindungskassetten-Transporter, Unterfamilie A, Mitglied 6	AGCCTGGAGTGACCACATC CCTCCGCCATTTCTTGAGC	65 °C	2,00	250 bp

## Materialien

Bettina Ibold

<b><i>Abca9</i></b> ATP-Bindungskassetten-Transporter, Unterfamilie A, Mitglied 9	CCCTCCTTTTCACTGATTGG TTCGGAACAGCAGGACAAC	65 °C	2,00	237 bp
<b><i>Abcb1b</i></b> ATP-Bindungskassetten-Transporter, Unterfamilie B, Mitglied 1B	GGCGTATTTGGGATGTTTCG CCTGGATGTAGGCAACTATGAG	65 °C	1,83	295 bp
<b><i>Abcb4</i></b> ATP-Bindungskassetten-Transporter, Unterfamilie B, Mitglied 4	GTGTCCCAGGAACCCATTCTC GTGGCTTCATCCAGCAGTAGG	63 °C	1,86	263 bp
<b><i>Abcb11</i></b> ATP-Bindungskassetten-Transporter, Unterfamilie B, Mitglied 11	GGAAGAGCACAGCACTAC CCAGAAGCAGGATCTTGG	63 °C	1,96	369 bp
<b><i>Abcc1</i></b> ATP-Bindungskassetten-Transporter, Unterfamilie C, Mitglied 1	TGGCATCACCTTCTCCATTTC GGTGCCCAAACAGTATGTTC	59 °C	1,93	206 bp
<b><i>Abcc2</i></b> ATP-Bindungskassetten-Transporter, Unterfamilie C, Mitglied 2	GGTGTGGGCTTATGGTTC GCAGCAAGTTCCTGAGTTC	59 °C	1,88	217 bp
<b><i>Abcc3</i></b> ATP-Bindungskassetten-Transporter, Unterfamilie C, Mitglied 3	AAGCAGCAGAACCAAGCATC AATAGCAGTCCGTAGCCTCAAG	59 °C	2,00	369 bp
<b><i>Abcd1</i></b> ATP-Bindungskassetten-Transporter, Unterfamilie D, Mitglied 1	CAATGGCTGTGGCAAGAG TGGAGAGCAGTGCGATAC	59 °C	1,83	446 bp
<b><i>Abcd2</i></b> ATP-Bindungskassetten-Transporter, Unterfamilie D, Mitglied 2	GCTTCCAGGCTAACTTC GGCACTGGTACATTCATC	63 °C	1,99	435 bp
<b><i>Abcg1</i></b> ATP-Bindungskassetten-Transporter, Unterfamilie G, Mitglied 1	AACGTGGATGAGGTTGAG TTCCCAGAGATCCCTTTC	59 °C	1,93	203 bp
<b><i>Abcg5</i></b> ATP-Bindungskassetten-Transporter, Unterfamilie G, Mitglied 5	CTGCTGAGGCGAGTAACAAG AATGACCGTGGCGATGAC	59 °C	1,84	333 bp
<b><i>Abcg8</i></b> ATP-Bindungskassetten-Transporter, Unterfamilie G, Mitglied 8	AATGCCCTCTACAACCTCC CTGATGCCGATGACAATG	59 °C	1,87	263 bp
<b><i>Apoa1</i></b> Apolipoprotein A-I	AAGAAGAGCTGGACACCCAGAC GCCCAAGGAGGAGGATTCAAAC	59 °C	1,86	247 bp

## Materialien

Bettina Ibold

<b><i>Apoa2</i></b> Apolipoprotein A-II	GATATGCAGAGCCTGTTC CTGGCACATCTCACTTAG	59 °C	1,91	235 bp
<b><i>Apoa4</i></b> Apolipoprotein A-IV	GTGTAGCCGAACTGTCC GAGCTGCTGAGTGACATC	59 °C	1,81	213 bp
<b><i>Apob</i></b> Apolipoprotein B	TGGCTCTGATCCCAAATCC ACTTGAGGGCTGGCATTAC	65 °C	2,00	279 bp
<b><i>Apoc1</i></b> Apolipoprotein C-I	TTCATCGCTCTTCCTGTC CGTGGTCTTCAACTTCTC	59 °C	2,00	249 bp
<b><i>Apoc3</i></b> Apolipoprotein C-III	TGCAGGAGTCCGATATAG GGGTGAAGACATGAGAAC	59 °C	2,00	265 bp
<b><i>Apod</i></b> Apolipoprotein D	CAACTACTCGCTGATGGAGAAC CACATGGAAGAGCCAGAAGAAG	63 °C	2,00	238 bp
<b><i>Apoe</i></b> Apolipoprotein E	CGTGCTGTTGGTCACATTGC TCCATCAGTGCCGTCAGTTC	59 °C	1,93	207 bp
<b><i>Hmgcr</i></b> 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl- Coenzym A-Reduktase	AGGACTGTGAGGCTACAATG GCGTTATCGTCAGGATGATG	59 °C	1,83	222 bp
<b><i>Fdps</i></b> Farnesylpyrophosphatsynthase	GCAGCCCTACTACCTGAAC GAAGAACTCGCCCATCTCC	59 °C	1,88	271 bp
<b><i>Fdft1</i></b> Squalensynthase	CATGCCTGCCGTCAAAGCTATC ATCCTTTCTCTGCCAGTTCC	59 °C	2,00	410 bp
<b><i>Ggps1</i></b> Geranylgeranylpyrophosphat- synthase 1	AGATCATCGTGGAACCGTCAG TCCGGGTGATCAAGGGTTAAG	65 °C	2,00	368 bp
<b><i>Lss</i></b> Lanosterinsynthase	CGAGTTCCTGCGGCTTTCAC TCTGCTGCCCTGTAGTCTGG	59 °C	2,00	420 bp
<b><i>Soat1</i></b> Sterol-O-Acyltransferase 1	TGTCCAATGTCCCATACG TCTCACTGGCAAACCTCC	59 °C	1,98	106 bp

## Materialien

Bettina Ibold

<b><i>Soat2</i></b> Stero-O-Acyltransferase 2	GAGCGACAAGATGAATGC ATGCTGGAACCGAATAGG	59 °C	1,96	266 bp
<b><i>Lipc</i></b> Hepatische Lipase	CGGGAAGAACAAGATTGG TGATGGTCTGGGTTATGG	59 °C	2,00	281 bp
<b><i>Lpl</i></b> Lipoproteinlipase	GTCGCCTTTCTCCTGATG CTCTTGGCTCTGACCTTG	59 °C	1,90	385 bp
<b><i>Nr1c1</i></b> Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor $\alpha$	GGCTGTAAGGGCTTCTTTTCG ATCGGACCTCTGCCTCTTTG	59 °C	1,71	454 bp
<b><i>Nr1c2</i></b> Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor $\beta$	ACGCACCCTTTGTCATCC GAAGAGGCTGCTGAAGTTGG	63 °C	2,00	200 bp
<b><i>Ldlr</i></b> <i>Low-density lipoproteins</i> Rezeptor	TTCCAGTGGCCGTCTCTATTG TCACATCTGAACCCGTGAGTC	59 °C	1,92	209 bp
<b><i>Pcsk9</i></b> Proteinkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9	TGGTGCTGATGGAGGAGAC GCTCTGGGCGAAGACAAAG	59 °C	1,97	221 bp
<b><i>Lrp10</i></b> <i>Low-density lipoproteins</i> Rezeptor- bezogenes Protein 10	CCTCTACAGCCACCAATCTCC CGCAGGCATCAATCCCATC	59 °C	1,93	229 bp
<b><i>Scarb1</i></b> <i>Scavenger</i> -Rezeptor B1	GAGAACCGCAGCCTCCATTTCC GCCCCGTGAAGACAGTGAAGACC	59 °C	1,98	330 bp
<b><i>Lcat</i></b> Phosphatidylcholin-Sterol- Acyltransferase	CACCATCTGGCTGGATTTC AAC AAGCGGCATACATCTCCTCTAC	59 °C	1,85	338 bp
<b><i>Pltp</i></b> Phospholipid-Transferprotein	CAGACGTGTACGGCGCAAAG ACACCGTCCCAGCATGGTAG	59 °C	1,87	429 bp
<b><i>Cyp7a1</i></b> Cholesterin-7 $\alpha$ -Monooxygenase	GCGTCCCTATTCACTTGTTTC GGCTGCTTTTCATTGCTTC	59 °C	2,00	269 bp
<b><i>Cyp27a1</i></b> Sterol-26-Hydroxylase	CAACCTCCTTTGGGACTTAC TTCAGCAGCCTCTGTTTC	59 °C	1,87	210 bp

<b><i>Cyp46a1</i></b> Cholesterin-24-Hydroxylase	GAGGTTGTCGGTTCCAAGAG AGCGGTCAGGGTTGAAAG	59 °C	2,00	247 bp
<b><i>Srebf2</i></b> Sterolregulationselement 2	CGCAAAGGTCAAGGATGAAC GACGCTCAAGACAATCACAC	59 °C	1,93	277 bp
<b><i>Ankra2</i></b> Ankyrin-Wiederholungsprotein 2, Familie A	CTACCTGGCTACTCGTATTG CATCTTCACGCACTTCAC	59 °C	1,91	310 bp
<b><i>Hmgcs2</i></b> 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl- CoenzymA-Synthase 2	ATGCCCGGTGTCCCGTCTAATG CATGAGCCTGTGGCGCTGATTG	59 °C	1,83	218 bp
<b><i>Lep</i></b> Leptin	GTTCAAGCAGTGCCTATC TCCAGGTCATTGGCTATC	59 °C	1,89	249 bp
<b><i>Nr1h3</i></b> Oxysterin-Rezeptoren LXR $\alpha$	TGAAGCGGCAAGAAGAGGAAC GCTCAGTAAAGTGGGCAAAGC	59 °C	1,96	243 bp
<b><i>Nr1h4</i></b> Gallensäure-Rezeptor	CAACCGGAAGACTGGTATTCTC ACACGGCGTTCTTGGAATG	65 °C	1,94	259 bp
<b><i>Sorl1</i></b> Sortilin-bezogener Rezeptor	CAGTGCGACCGATTGAG CTCCAACCACCCTGTAGTAG	59 °C	1,94	382 bp
<b><i>Crp</i></b> C-reaktives Protein	TCCCAGCAGCATCCATAGC ACTTCAGCACCACCCACTC	63 °C	1,92	322 bp

## 5.4 Kommerzielle Reaktionssysteme

<i>Agilent RNA6000 Pico Kit</i>	Agilent Technologies, Ratingen
<i>Bicinchoninsäure (BCA) Kit</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit</i>	Thermo Fisher, Schwerte
<i>HDL and LDL/VLDL Quantification Colorimetric/Fluorometric Kit</i>	BioVision Incorporated, Milpitas, USA
<i>Kapa-Mouse Genotyping Kit</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>LCAT Activity Assay Kit</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>LightCycler 480 SYBR Green I Master Kit</i>	Roche, Mannheim
<i>LPL Activity Assay Kit</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Mouse Cyp27a1 ELISA Kit</i>	Abbexa Ltd., Cambridge, UK
<i>Mouse LPL ELISA Kit</i>	Biozol Diagnostica GmbH, Eching

<i>Mouse oxLDL ELISA Kit</i>	Cloud-Clone Corp., Houston, USA
<i>Mouse PCSK9 ELISA Kit</i>	Bio-Techne Ltd., Abingdon, UK
<i>MSB Spin PCRapace Kit</i>	Strattec, Essen
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>RT<sup>2</sup> First Strand Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array, (PAMM-080Z)</i>	Qiagen, Hilden
<i>RT<sup>2</sup> SYBR Green qPCR reaction mixture</i>	Qiagen, Hilden
<i>Superscript II Reverse Transcriptase Kit</i>	Thermo Fisher, Schwerte

## 5.5 Verbrauchsmaterialien

Adhäsionsobjektträger SuperFrost Plus	Thermo Fisher, Schwerte
Adhäsive qPCR Folie	Sarstedt, Nümbrecht
Autoklavierband, Dampf	Roth, Karlsruhe
Konduktive Spitzen	P. Sudmann, Leopoldhöhe
Kryomolschälchen	Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, NL
Lysing Matrix D Gefäße	MP Biomedicals, Eschwege
Multi-Kavitäten Platten, transparent (96-Kavitäten)	Sarstedt, Nümbrecht
PCR-Reagiergefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylen Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran	Thermo Fisher, Schwerte
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
<i>Receiver columns</i>	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Bottrop
Tris-Glycin Mini Protein Gele (8-16 %)	Thermo Fisher, Schwerte
Deckgläser	Thermo Fisher, Schwerte
Pipettenspitze, farblos	Sarstedt, Nümbrecht
96-Kavitäten/ Polypropylen Platten (U-Boden, schwarz)	Greiner Bio-One GmbH, Bad Nenndorf
384-Kavitäten Lightcycler Platte (weiß)	Sarstedt, Nümbrecht

## 5.6 Längen- und Größenstandards

pUC19/MspI DNA-Leiter	MBBL, Bielefeld
<i>Spectra Multicolor High Range Protein Ladder</i>	Thermo Fisher, Schwerte



## 5.7 Antikörper

*Rat anti-mouse Mrp6 (Clone M<sub>6</sub>II-24)*

Biozol Diagnostica GmbH, Eching

*Rabbit anti-rat IgG-HRP*

Abcam, Cambridge, UK

## 5.8 Geräte

Analysewaage

Sartorius AG, Göttingen

AB3500 Genetic Analyzer

Thermo Fisher, Schwerte

Autoklav 5075 ELV

Tuttnauer, Breda, NL

Bioanalyzer 2100

Agilent Technologies, Ratingen

Brutschrank

Memmert GmbH&Co.KG, Schwabach

Eismaschine

Ziegra Eismaschinen, Isernhagen

Feinwaage

Sartorius AG, Göttingen

Gelelektrophoresekammer

Bio-Rad Laboratories

Genetic Analyzer 3500

Thermo Fisher, Schwerte

Heratherm Ofen

Thermo Fisher, Schwerte

Landgraf Thermocycler Various

Laborsysteme GmbH, Langenhagen

Leica CM3050S Kryostat

Leica Microsystems, Wetzlar

LightCycler 480 II

Roche, Mannheim

MagNALyser

Roche, Mannheim

Mikrowelle

AEG, Dormagen

Nano Drop 2000

Thermo Fisher, Schwerte

Nikon Eclipse TE2000-S

Nikon Instruments, Düsseldorf

Nikons Digital Sight DS-U3

Nikon Instruments, Düsseldorf

Pipettierroboter Corbett Robotics CAS-1200

Qiagen, Hilden

Sicherheitswerkbank Safeflow 1.2

Cruma, Barcelona, Spanien

Tecan-Reader infinite 200 PRO

Tecan, Männedorf, Schweiz

Tisch-pH-Meter FiveEasy Plus

Roth, Karlsruhe

Thermocycler T-Gradient

Biometra, Göttingen

UV-Transilluminator Infinity 3000

Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Vortex Paramix 3

Ulabo Labortechnik GmbH, Seelbach

Zentrifuge Biofuge 13

Heraeus, Hanau

Zentrifuge EP5430R

Eppendorf, Hamburg

Zentrifuge MiniStar silverline

VWR International GmbH, Langenfelde

Zentrifuge Rotanta 460R

Hettich, Tuttlingen

## 5.9 Software und Datenbanken

Clone Manager Professionel 9.0

geNorm

GraphPad Prism 5

i-Control Software

Image J

LightCycler 480 Software

Nanodrop 2000/2000c

Nikon's NIS Element

Primer-BLAST

PubMed

Qiqqa Reference and Research Manager

RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array:

web-based data analysis software

*Sequence Analysis 3.7*

Scientific & Educational Software, USA

[http://medgen.ugent.be/~jvd esomp/genorm/](http://medgen.ugent.be/~jvd_esomp/genorm/)

Graphpad Software Inc., USA

Tecan, Crailsheim

<https://imagej.nih.gov/ij/>

Roche, Mannheim

Thermo Fisher, Schwerte

Nikon Instruments, Düsseldorf

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Quantisile Ltd., London UK

Qiagen, Hilden

[www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php](http://www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php)

Perkin Elmer, Verlbert

## 6 Methoden

### 6.1 Maushaltung

Die Pflege der Tiere und deren Präparation wurden unter Berücksichtigung der Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis und im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz (TierSchG) sowie der europäischen Richtlinie 2010/63/EU durchgeführt. Die Unterbringung und Versorgung der Tiere erfolgte in der Zentralen Tierhaltung der Universität Bielefeld in der biologischen Fakultät unter Leitung von Herrn Dr. Axel Ziesenis durch geschultes Personal. Alle Tiere wurden unter spezifiziert pathogen-freien Bedingungen in standardisierten Käfigen gehalten. Trinkwasser und natürliches Futter (V1536-000, Extrudat, sniff Spezialdiäten GmbH, Soest; s. Tab. 9) standen *ad libitum* zur Verfügung.

**Tabelle 9: Herstellerangaben zur Zusammensetzung des Alleinfuttermittels für Mäuse**

Rohnährstoffe	[%]	Energie	[MJ/kg]
Rohprotein (N x 6,25)	19,1	Umsetzbare Energie	13,9
Rohfett	3,6	davon	
Rohfaser	5,1	Kohlenhydrate	67 %
Rohasche	6,5	Protein	23 %
Stärke	35,3	Fett	10 %
Zucker	4,8		
N-free Extraktstoffe	55,9		

Als Mausmodell wurden *Abcc6*-defiziente Mäuse verwendet, welches von Gorgels *et al.* gestellt wurde [39]. Die Generierung des *Knockouts* erfolgte durch Einführung eines Hygromycin-Resistenzgens in die DNA-Sequenz von *Abcc6*, wobei die Exons 16, 17 und große Teile von Exon 18 der *Abcc6*-Sequenz deletiert wurden. Die *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse besitzen einen gemischt genetischen Hintergrund der Linien C57BL/6- und 129/Ola und wurden wiederholt rückgekreuzt mit dem Inzuchtstamm C57BL/6. Die hier verwendeten *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse sind charakterisiert durch die Entwicklung von Kalzifizierungen in den mittelgroßen Blutgefäßen der Niere, sowie mit steigendem Lebensalter auch großer, kleiner Gefäße und der Kapillaren der Niere, anderer Organe und der Bruch-Membran des Auges [39]. Es wurden für die nachfolgenden Experimente 154 Tiere präpariert. In Tabelle 10 sind Alter, Genotyp und Geschlecht der präparierten Tiere dargestellt.

**Tabelle 10: Alter, Genotyp und Geschlecht der analysierten Mäuse.**

Alter	Genotyp	Geschlecht	Anzahl der präparierten Tiere
6 Monate $\pm$ 2 Wochen	Wildtyp	männlich	16
6 Monate $\pm$ 2 Wochen	Wildtyp	weiblich	12
6 Monate $\pm$ 2 Wochen	<i>Abcc6</i> <sup>-/-</sup>	männlich	13
6 Monate $\pm$ 2 Wochen	<i>Abcc6</i> <sup>-/-</sup>	weiblich	11
12 Monate $\pm$ 4 Wochen	Wildtyp	männlich	30
12 Monate $\pm$ 4 Wochen	Wildtyp	weiblich	22
12 Monate $\pm$ 4 Wochen	<i>Abcc6</i> <sup>-/-</sup>	männlich	27
12 Monate $\pm$ 4 Wochen	<i>Abcc6</i> <sup>-/-</sup>	weiblich	23

## 6.2 Mauspräparation und Gewebelagerung

Es wurden zu experimentellen Zwecken 6 Monate  $\pm$  2 Wochen, sowie 12 Monate  $\pm$  4 Wochen alte Tiere präpariert. Den Tieren wurden 0,65 mg Ketamin, 0,02 mg Acepromazin und 0,13 mg Xylazin pro 10 g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurden die Mäuse durch Ausbluten *via* Punktion des retrobulbären Venenplexus und zervikaler Dislokation getötet. Der Brust- und Bauchraum wurden geöffnet. Der rechte Herzvorhof wurde für eine anschließende Leberperfusion mit DPBS (1x) über die *Vena portae* angeschnitten. Es erfolgte die Entnahme der Leber, der Nieren, der Vibrissen, sowie des perigonadalen weißen Fettgewebes. Die Gewebe wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Das abgenommene Vollblut koagulierte für 30 min bei Raumtemperatur (RT), wurde anschließend für 10 min bei 3 000 x g zentrifugiert, das Serum abgenommen und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

## 6.3 Molekularbiologische Methoden

### 6.3.1 Genotypbestimmung transgener Mäuse

Die Genotypbestimmung transgener Mäuse erfolgte aus Ohrlochmarken mit Hilfe des *Kapa-Mouse Genotyping Kit* (Sigma-Aldrich). Die DNA aus den Gewebestücken wurde nach Herstellerangaben extrahiert (s. Tab 11) und 1:10 mit 10 mM Tris-HCL Puffer (pH 8,0-8,5) verdünnt. Es folgte eine Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) mit einem Oligonukleotide-Paar, das vor und nach dem potentiellen Insertionsloкус bindet sowie mit einem weiteren Oligonukleotid, das einen Teil der transgenen Sequenz erkennt (s. Tab. 12) [39]. Die PCR-Produkte spezifischer Basenlänge wurden direkt mittels

Agarose-Gelelektrophorese getrennt, da DNA-Ladepuffer und ein DNA-Farbstoff im *Hotstart Genotyping Mix* enthalten waren.

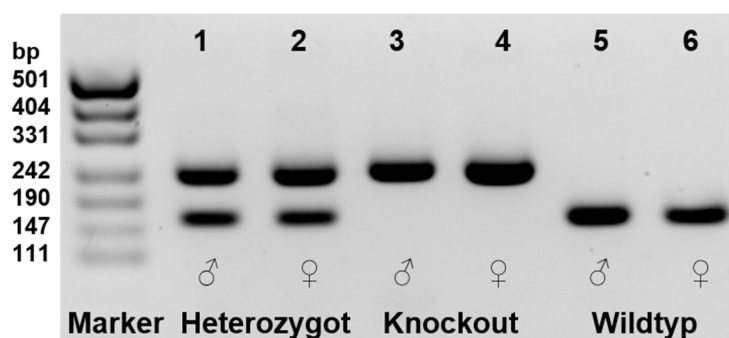
**Tabelle 11: Reaktionsansatz 25 µL zur Genotypbestimmung von Mäusen.**

Reagenz	Volumen (1x)
<i>Hotstart Genotyping Mix</i> (2x)	12,5 µL
Primer 18F, 18R, T2 (25 pmol/µL)	0,25 µL
DNA Rohextrakt	2,00 µL
Wasser	9,75 µL

**Tabelle 12: Temperaturprofil der PCR zur Genotypbestimmung.**

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
initiale Denaturierung	180 sec	95 °C	1
Denaturierung	15 sec	95 °C	35
Annealing	15 sec	63.6 °C	
Elongation	15 sec/kb	72 °C	
finale Elongation	60 sec/kb	72 °C	1

Eine exemplarische Aufnahme des Nachweises der PCR-Produkte zur Genotypbestimmung der Versuchstiere im analytischen Agarosegel ist in Abbildung 26 gezeigt. Die Primer 18F und 18R amplifizierten ein 163 bp großes Fragment aus dem Exon 18 des *Abcc6*-Gens eines Wildtyp-Allels. Die Primer 18R und T2 dagegen amplifizierten ein 246 bp großes Fragment, welches einen Teil des Exons 18 des *Abcc6*-Gens und einen Teil des Hygromycin-Resistenzgens, welches den *Knockout* verursacht, einschließt.



**Abbildung 26: Nachweis der PCR-Amplifikate zur *Abcc6*-Genotypbestimmung im analytischen Agarosegel.** Marker: pUC19/MspI DNA-Leiter; Amplifizierte PCR-Produkte des *Abcc6*-Gens von heterozygoten Mäusen (Spur 1 und 2), von *Knockout*-Mäusen (Spur 3 und 4) und von Wildtyp-Mäusen (Spur 5 und 6).

### 6.3.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus ca. 100 mg murinem Gewebe der Leber, der Niere und des weißen Fettgewebes erfolgte mit Hilfe von QIAzol Lyse Reagenz (Qiagen), MagNALyser (Roche) und dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) nach Herstellerprotokoll. DNA-Verunreinigungen wurden auf der Säule durch eine 15 minütige Inkubation mit einer DNase-Reaktionslösung, bestehend aus einer 1:10 Verdünnung aus rDNase und DNase Reaktionspuffer (Qiagen), entfernt. Die Eluierung der RNA erfolgte mit 30 µL RNase freiem Wasser bei einer Zentrifugation von 1 min bei 13 000 x g. Die RNA wurde bei -80 °C bis zum Gebrauch gelagert.

### 6.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Gesamt-RNA wurde mit dem Nanodrop 2000 (VWR International GmbH) spektralphotometrisch beim Absorptionsmaximum von 260 nm bestimmt. Für eine Analyse wurden 1,5 µL Probe aufgetragen und gegen das jeweilige Lösungsmittel, in diesem Fall Wasser, gemessen. Die Berechnung der RNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes, welches die Absorption in Abhängigkeit der Konzentration des Analyten und der Schichtdicke beschreibt.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

A: Absorption

$\varepsilon$ : Absorptionkoeffizient [ $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]

c: Konzentration [ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ]

d: Schichtdicke der Küvette [cm]

Die Probenreinheit kann durch die Bildung der Quotienten 260 nm/280 nm und 260 nm/230 nm erfasst werden, um Kontaminationen mit Proteinen, Salzen und Lösungsmitteln auszuschließen.

### 6.3.4 Bestimmung der RNA-Integrität

Die Integrität der RNA ist essentiell für eine erfolgreiche Quantifizierung mittels quantitativer *real-time* PCR (qPCR). Es besteht die Möglichkeit der RNA-Degradierung durch ubiquitär vorkommende Ribonukleasen. Die Qualität der isolierten RNA wurde mit Hilfe des *Agilent RNA 6000 Nano Kit* (Agilent Technologies) nach Herstellerangaben im Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) analysiert. Die Technik beruht auf dem Prinzip der Kapillar-Gelelektrophorese. Nach der Analyse berechnet die Bioanalyzer 2100 Expert Software die RNA-Integritätsnummer (RIN), die unter Einbeziehung des Verhältnisses der ribosomalen Untereinheiten 28S- und 18S-rRNA sowie deren degradierten Abbauprodukte

einberechnet wird. Der RIN-Wert gibt die Qualität der RNA wieder, wobei der RIN-Wert 10 einer komplett intakten und damit einer hohen RNA-Qualität entspricht und der Wert 1 einer vollständig degradierten RNA schlechter Qualität.

### 6.3.5 Synthese der cDNA

Die reverse Transkription ermöglicht die Synthese von cDNA (*complementary* DNA). Es wurde 1 µg Gesamt-RNA in einem Reaktionsvolumen von 24 µL mit dem *Superscript II Reverse Transcriptase Kit* (Thermo Fisher) nach Herstellerangaben umgeschrieben. Dafür wurden Oligo-dT-Primer (0,5 µg/µL) verwendet, welche an die Poly(A)-Enden der messenger RNA (mRNA) binden, sodass nur die polyadenylierte mRNA umgeschrieben wurde. Die Proben wurden bis zur quantitativen *real-time* PCR-Analyse (qPCR) bei -20 °C gelagert.

Zusätzlich wurden 400 ng RNA mit Hilfe des *RT<sup>2</sup> First Strand Kit* (Qiagen), nach Herstellerprotokoll, in cDNA umgeschrieben. Diese Proben wurden im *RT<sup>2</sup> Profiler-PCR-Array* (Qiagen) eingesetzt.

### 6.3.6 Quantitative *real-time* PCR

Die PCR ist eine Methode zur Amplifikation definierter Nukleinsäure-Sequenzen unter Verwendung spezifischer Primer-Paare, bestehend aus einem *forward* (5'-3') und einem *reverse* Primer (3'-5'). Eine PCR untergliedert sich in drei Reaktionsschritte. Im ersten Schritt wird der DNA-Doppelstrang bei 95 °C in Einzelstränge denaturiert. Im zweiten Schritt hybridisieren die Primer mit dem komplementären DNA-Einzelstrangabschnitt bei einer spezifischen *Annealing*-Temperatur. Im letzten Schritt erfolgt die Elongation der freien 3'-Hydroxygruppe der Primer durch die Polymerase bei 72 °C. Die zyklische Wiederholung dieser drei Reaktionsschritte ermöglicht die selektive Synthese definierter Amplifikate. Mit Hilfe der qPCR wurde die Expression bestimmter Zielgene im Leber-, Nieren- und weißen Fettgewebe von *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu den Wt-Mäusen am LightCycler 480 (Roche) quantifiziert. Das eingesetzte Fluorophor *SYBR-Green* des *LightCycler 480 SYBR Green I Master Kit* (Roche) interkaliert während der Amplifikation in doppelsträngige DNA. Die Detektion des gebildeten Farbstoff-DNA-Komplexes erfolgt durch die Extinktion bei einer Wellenlänge von 480 nm und der Emission bei einer Wellenlänge von 520 nm nach jedem Amplifikationszyklus. Die Fluoreszenzintensität des Signals ist proportional zur Menge an gebildetem PCR-Produkt. Die Zyklenzahl, bei der die Fluoreszenzintensität einen Schwellenwert und damit das Hintergrundsignal überschreitet und die Amplifikation in die exponentielle Phase übergeht, wird als *Cycle Threshold*-Wert (C<sub>T</sub>-Wert) definiert. Der C<sub>T</sub>-Wert ist abhängig von der Konzentration an cDNA/mRNA, das vor den Amplifikationszyklen vorlag, und ermöglicht damit einen

Vergleich von verschiedenen Proben. Es folgt eine Schmelzkurven-Analytik am Ende der Amplifikation zur Identifizierung der Amplifikatspezifität. Anschließend wurde die Spezifität der Amplifikation durch die Sequenzierung der PCR-Produkte überprüft.

Der PCR-Ansatz für die qPCR setzt sich wie folgt zusammen:

**Tabelle 13: 10 µL Reaktionsansatz für den Einsatz in der qPCR.**

Reagenz	Volumen (1x)
<i>LightCycler 480 SYBR-Green I Master</i>	5,00 µL
<i>Forward Primer</i> (25 µM)	0,25 µL
<i>Reverse Primer</i> (25 µM)	0,25 µL
Wasser	2,00 µL
<i>Template</i> (cDNA 1:10 oder 1:5 verdünnt)	2,50 µL

Die Proben wurden unter Verwendung des Pipettierroboters (Qiagen) in 384-Kavitäten Platten pipettiert, mit einer optischen adhäsiven Folie verschlossen und 1 min bei 1000 x g zentrifugiert. Es wurden Intron-überspannende Primer genutzt und jede Reaktion als Triplikat untersucht und für jedes Primer-Paar eine Wasserkontrolle mitgeführt. Das Temperaturprofil der qPCR für den LightCycler 480 ist in Abbildung 27 gezeigt.



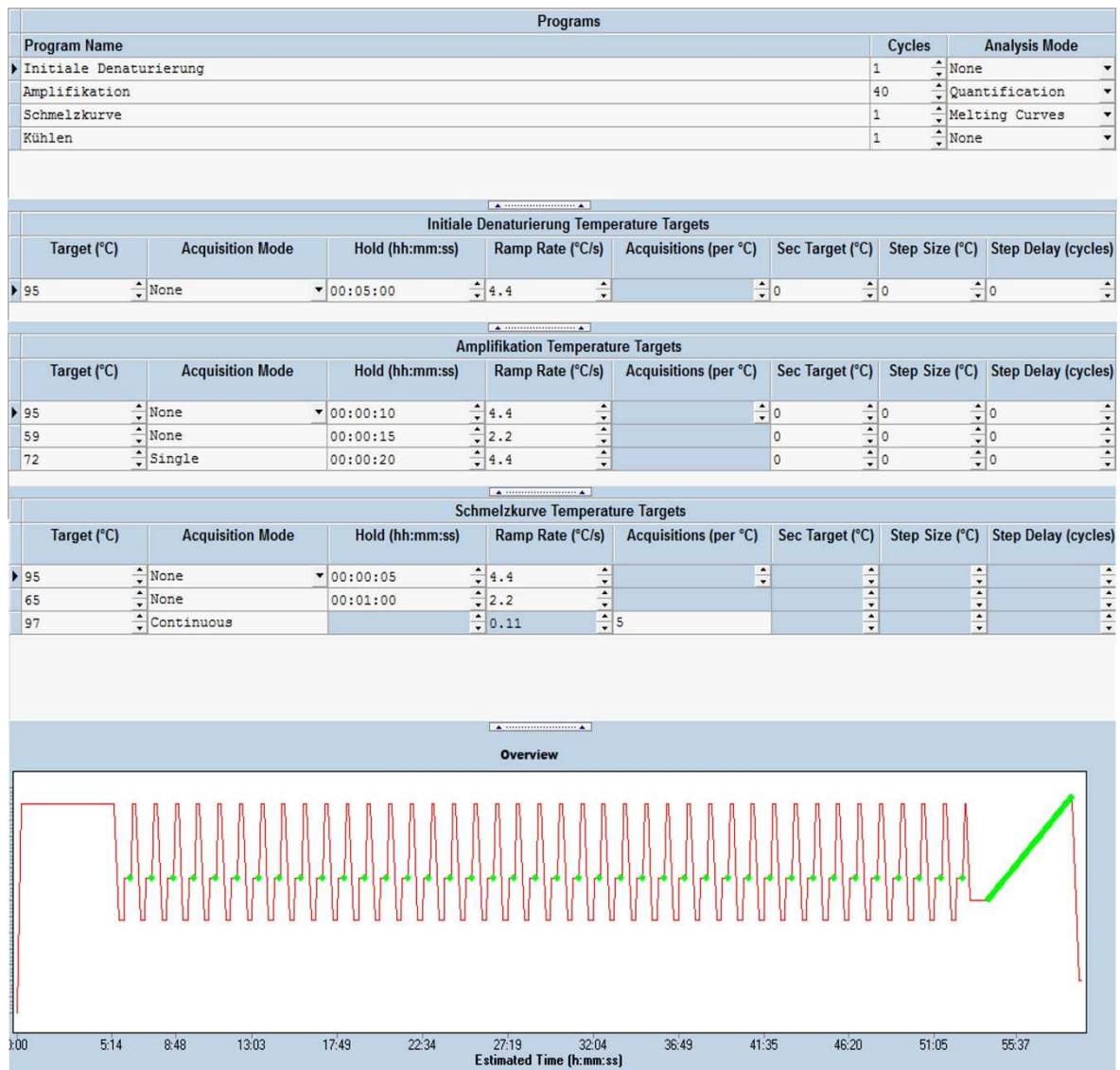


Abbildung 27: Temperaturprofil der qPCR.

### 6.3.7 Auswertung der quantitativen *real-time* PCR

Für die Auswertung der qPCR-Daten wurde zunächst ein Normalisierungsfaktor aus dem geometrischen Mittel der  $C_T$ -Werte der drei Referenzgene berechnet. Es handelt sich um Gene, die durch eine nicht-regulierte und somit gleichbleibende Genexpression charakterisiert sind. Die geeignetsten Referenzgene mit der stabilsten Expression wurden mit Hilfe der geNorm-Software ermittelt. Das Programm analysiert für jedes Referenzgen paarweise Variationen mit allen anderen Referenzgenen und berechnet auf dieser Basis das Stabilitätsmaß  $M$ . Die Expressionsstabilität eines Referenzgenes ist umso größer, je niedriger der berechnete  $M$ -Wert ist [367]. Für die Analyse der Genexpression verschiedener Zielgene im Gewebe von 6 Monate alten Mäusen wurden die Referenzgene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*Gapdh*), Hypoxanthin-

Phosphoribosyltransferase 1 (*Hprt*) and Beta-2-Mikroglobulin ( $\beta 2m$ ) und zur Genexpressionsanalyse verschiedener Zielgene im Gewebe von 12 Monate alten Mäusen die Referenzgene *Gapdh*, *Hprt* and Eukaryotischer Translations-Initiationsfaktor 3 Untereinheit A (*Eif3a*) genutzt. Nach Berechnung der normalisierten Expressionsraten des Zielgens unter Einbeziehung der PCR-Effizienz (s. Tab. 8) wurde die relative Expression (R-Wert) mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode [368] bestimmt. Bei einer idealen PCR-Effizienz würde sich pro Amplifikations-Zyklus die DNA-Menge verdoppeln. Die realen Effizienzen liegen meist unter dem idealen Wert von 2. Zur Bestimmung der spezifischen Effizienz für jede PCR-Reaktion wurde eine serielle cDNA-Verdünnung erstellt (1:5 bis 1:500). Der *Cut-Off*-Wert, um festzulegen, wann eine mRNA-Expression nicht mehr detektierbar ist, wurde auf einen  $C_T$ -Wert von 35 gesetzt. Die relative Expression aller Wt-Mäuse wurde auf 1 gesetzt. Daraus folgt, dass bei einer erhöhten Expression eines Zielgens im Gewebe der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäuse der R-Wert größer als 1 ist. Wird ein R-Wert unter 1 errechnet, liegt dementsprechend eine Erniedrigung der Expression des Zielgens im Vergleich zu den Wt-Mäusen vor.

### 6.3.8 Reinigung von PCR-Produkten

Die PCR-Produkte wurden per Affinitätschromatographie von überschüssigen Primern und dNTPs mit dem *MSB Spin PCRapace Kit* nach den Herstellerangaben gereinigt. Die gereinigten PCR-Produkte wurden in 15  $\mu$ L Wasser eluiert und das Eluat in einer Sequenzierreaktion eingesetzt.

### 6.3.9 Sequenzierung von PCR-Produkten

Die Sequenzierung basiert auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger [369]. Neben dNTPs wie in einer PCR werden Didesoxynukleotide, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, zufällig in den DNA-Strang eingebaut. Dadurch kommt es zum Kettenabbruch bei der Amplifikation mit dem *Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Thermo Fisher). Es entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, welche in einer Kapillarelektrophorese getrennt und danach detektiert werden.

Die gereinigten PCR-Produkte wurden als *Template* für den folgenden Sequenzierungsansatz verwendet:

**Tabelle 14: Zusammensetzung einer Sequenzierungsreaktion.**

Reagenz	Volumen (1x)
<i>BigDye</i> v.3.1 Sequenzierprämix	4,0 µL
5x <i>BigDye</i> Sequenzierpuffer	2,0 µL
Primer (2,5 µM)	1,5 µL
<i>Template</i>	2,0 µL
Wasser	10,5 µL

**Tabelle 15: Temperaturprofil einer Sequenzierungsreaktion.**

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
initiale Denaturierung	120 sec	95 °C	1
Denaturierung	10 sec	95 °C	30
Annealing	10 sec	50 °C	
Elongation	240 sec	60 °C	
Kühlen	5 min	4 °C	1

Zur Reinigung der Sequenzierungsansätze mittels Gelfiltration wurden *Receiver columns* mit 750 µL Sephadex G50-Suspension in TE-Puffer beladen und 2 min bei 1000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die gereinigten PCR-Produkte mittig auf die Gelmatrix aufgetragen und 4 min bei 1000 x g zentrifugiert. Die Sephadex-Matrix hält kleine Moleküle zurück, während die PCR-Produkte eluiert werden. Das Eluat wurde mit 20 µL Wasser versetzt und 2 min bei 95 °C denaturiert. Die Proben wurden bei 10 kV für 30 sec in den Genetic Analyzer (Thermo Fisher) injiziert und die entstandenen Fragmente aus der Sequenzierungsreaktion 90 min mittels Kapillarelektrophorese bei einer Spannung von 8,5 kV und einer Temperatur von 50 °C getrennt. Die Basenabfolge der Fragmente wurde mit der Software *Sequence Analysis 3.7* bestimmt.

### 6.3.10 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines 2,5 %igen Agarose-Gels wurden 2,5 g Agarose durch Erhitzen in 100 mL TBE-Puffer (1x) gelöst und mit 10 µL Ethidiumbromid-Lösung (0,5 mg/mL) versetzt. Zur Überprüfung von PCR-Produkten wurden die Reaktionsansätze im Verhältnis 1:5 mit DNA-Ladepuffer vermischt und 5 µL in die Geltaschen des Agarosegels aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgte im elektrischen Feld bei einer Spannung von 140 V für 40 min in TBE-Puffer (1x). Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren und wurde im UV-Transilluminator Infinity 3000 (PepqLab Biotechnologie GmbH) detektiert und dokumentiert. Zur Bestimmung der Amplifikatgrößen wurden 3 µL des pUC19/MspI DNA-Längenstandards verwendet.

### 6.3.11 RT<sup>2</sup> Profiler-PCR-Array

Der RT<sup>2</sup> Profiler-PCR-Array umfasste die parallele Analyse von 84 Zielgenen des Lipoproteinsignal- und des Cholesterinstoffwechsels. Zur Durchführung des Arrays wurden jeweils 4 unverdünnte Einzelproben zu einer Poolprobe gemischt. Verwendet wurden cDNA-Proben des Leber-, Nieren- und Fettgewebes. 10 µL des Reaktionsansatzes (s. Tab. 15) wurden pro Kavität in vorbeschickte Mikrotiterplatten pipettiert. Das Temperaturprogramm (s. Abb. 28) für den LightCycler 480 (Roche) umfasste die Aktivierung der Polymerase, 45 Amplifikationszyklen und eine Schmelzkurvenanalytik. Die Daten der Genexpression wurden mit Hilfe der online-basierten Analysesoftware von Qiagen ausgewertet ([www.SABioscience.com/pcrarraydataanalysis.php](http://www.SABioscience.com/pcrarraydataanalysis.php)).

Die Auswertung zur Ermittlung der Expressionsunterschiede (*Fold-Change*;  $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ ) zwischen den Wt-Mäusen und den *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen basiert auf der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode [368]. Der Expressionsunterschied stellt die normalisierte Genexpressionsrate der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Probe geteilt durch die normalisierte Genexpressionsrate der Wt-Probe dar.

**Tabelle 16: Reaktionsansatz für den RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array.**

Reagenz	Volumen (1x)
RT <sup>2</sup> SYBR Green Mastermix	650 µL
Reaktionsmix cDNA	102 µL
Wasser	548 µL

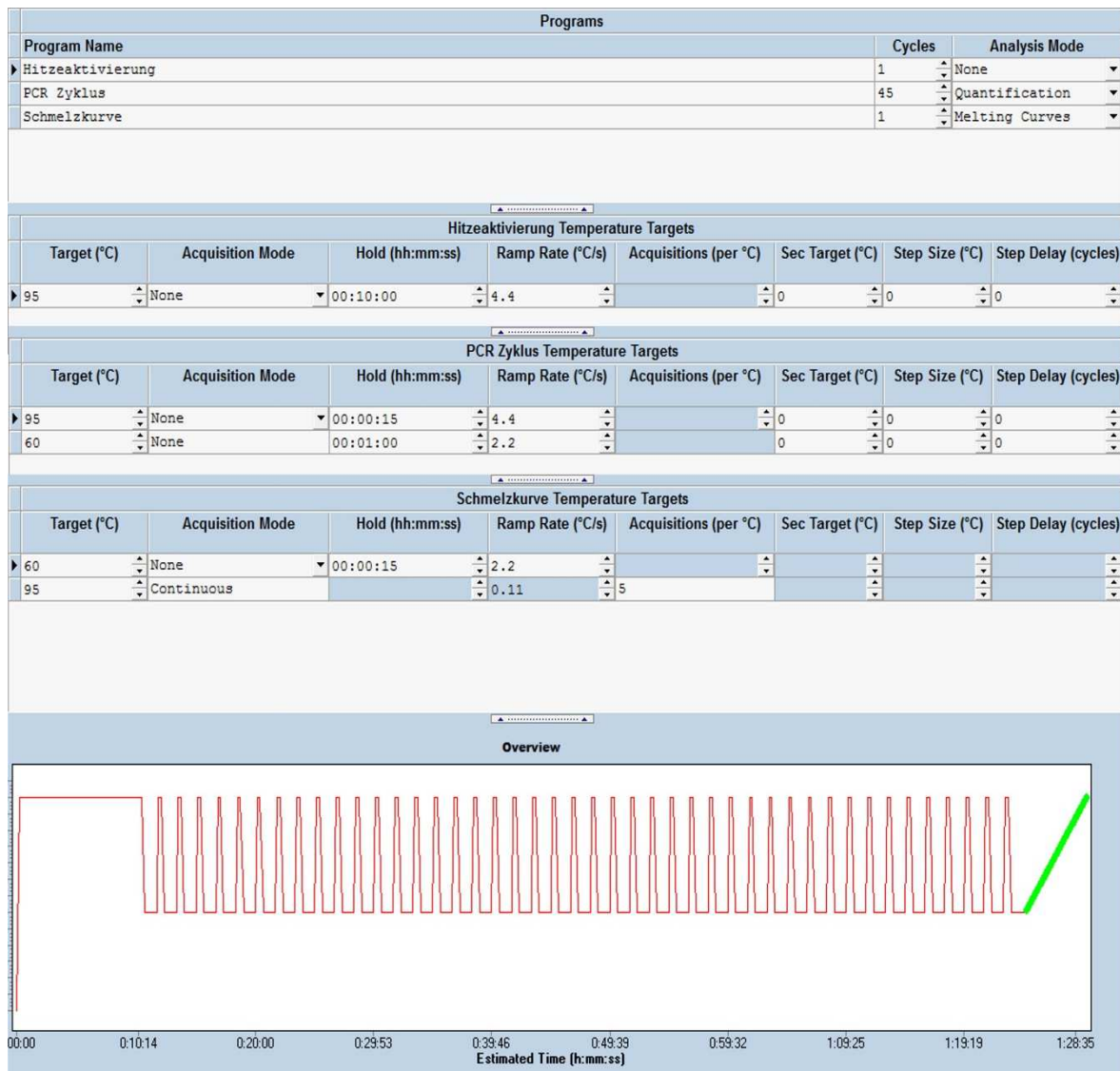


Abbildung 28: Temperaturprofil des RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays.

## 6.4 Biochemische Methoden

### 6.4.1 Bestimmung der Lpl-Konzentration mittels ELISA

Die Lpl-Konzentration im murinen Serum wurde mit Hilfe des kommerziellen *Mouse LPL ELISA Kits* (Biozol Diagnostica GmbH) nach Herstellerprotokoll bestimmt. Die Seren wurden vor der Analyse 1:20 in *Sample Diluent* verdünnt. Es wurden 100 µL Probe eingesetzt und Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Farbentwicklung erfolgte 20 min bei 37 °C unter Lichtausschluss. Die Reaktion wurde mit 50 µL Schwefelsäure gestoppt und der Farbumschlag bei einer Wellenlänge von 450 nm spektralphotometrisch detektiert.

#### 6.4.2 Konzentrationsbestimmung des oxLDL-Cholesterins mittels ELISA

Die Konzentration des oxLDL-Cholesterins im murinen Serum wurde mit Hilfe des kommerziellen *Mouse oxLDL ELISA Kits* (Cloud-Clone Corp.) nach Herstellerprotokoll bestimmt. Die Seren wurden vor der Analyse 1:100 in DPBS (1x) verdünnt. Es wurden 100 µL Probe eingesetzt und Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Farbentwicklung erfolgte 20 min bei 37 °C unter Lichtausschluss. Die Reaktion wurde mit 50 µL Schwefelsäure gestoppt und der Farbumschlag bei einer Wellenlänge von 450 nm spektralphotometrisch detektiert.

#### 6.4.3 Bestimmung Pcsk9-Konzentration mittels ELISA

Die Pcsk9-Konzentration im murinen Serum wurde mit Hilfe des kommerziellen *Mouse PCSK9 ELISA Kits* (Bio-Techne Ltd.) nach Herstellerprotokoll bestimmt. Die Seren wurden vor der Analyse 1:200 in *Calibrator Diluent* RD5-26 verdünnt. Es wurden 50 µL Probe eingesetzt und Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Farbentwicklung erfolgte 30 min bei RT unter Lichtausschluss. Die Reaktion wurde mit 50 µL Schwefelsäure gestoppt und der Farbumschlag bei einer Wellenlänge von 450 nm und 540 nm spektralphotometrisch detektiert.

#### 6.4.4 Lcat-Aktivitätsmessung im Serum

Die Bestimmung der Lcat-Aktivität im murinen Serum erfolgte mit Hilfe des kommerziellen *LCAT Activity Assay Kits* (Sigma-Aldrich) nach Herstellerangaben. Das Experiment basierte auf dem zweigipfligen Emissionsspektrum des zugesetzten Fluorophors (Wellenlänge von 390 nm und 470 nm), welches als Lcat-Substrat diente. Die relative Intensität des jeweiligen Signals ist abhängig von der Konzentration an hydrolysiertem und intaktem Fluorophor. Bei Vorhandensein von intaktem Substrat ist das Signal bei einer Wellenlänge von 470 nm intensiver. Nach der Hydrolyse des Lcat-Substrates verschiebt sich die Signalintensität zu einer Wellenlänge von 390 nm und die Intensität des Signals 470 nm nimmt ab. Die Seren wurden für die Analyse unverdünnt eingesetzt. Das Fluoreszenzsignal wurde nach einer 6 stündigen Inkubation bei 37 °C bei einer Wellenlänge von 390 nm und 470 nm (Signalverstärkung 100 %) spektralphotometrisch detektiert.

#### 6.4.5 Konzentrationsbestimmung des HDL- und LDL/VLDL-Cholesterins

Die Konzentration des HDL- und des LDL/VLDL-Cholesterins im murinen Serum wurde mit Hilfe des kommerziellen *HDL and LDL/VLDL Quantification Colorimetric/Fluorometric Kits* (BioVision Incorporated) nach Herstellerangaben bestimmt. Nach der Präzipitation wurden 10 µL der HDL- und 20 µL der LDL/VLDL-Suspension für die photometrische

Analyse eingesetzt. Das kolorimetrische Signal wurde nach einer 60 minütigen Inkubation bei 37 °C bei einer Wellenlänge von 570 nm spektralphotometrisch detektiert.

#### **6.4.6 Herstellung von Homogenaten aus Lebergewebe**

Zur Konzentrationsbestimmung des Enzyms Cyp27a1 im Lebergewebe wurden ca. 200 mg gefrorenes Lebergewebe in 800 µL kaltem DPBS (1x), abgefüllt in 2 mL Lysing Matrix D Gefäße, gegeben und mit Hilfe des MagNALysers (Roche) für 20 sec bei einer Geschwindigkeit von 5500 rpm zerkleinert. Die Proben wurden danach für 10 sec mit Ultraschall behandelt. Das homogenisierte Gewebe wurde anschließend 30 min bei 4 °C und 10 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in *Aliquots* bei -80 °C eingefroren und dort bis zum Gebrauch gelagert.

#### **6.4.7 BCA-Test zur Proteinkonzentrationsbestimmung**

Es wurde eine Bestimmung der Proteinkonzentration in den Leberhomogenaten vorgenommen, um die Cyp27a1-Konzentration auf den Gesamtproteingehalt des Gewebes zu normieren.

Zur Herstellung einer Standardgeraden wurde der 1000 µg/mL konzentrierte Proteinstandard (Sigma-Aldrich) mit Wasser verdünnt um einen Konzentrationsbereich von 200 bis 1000 µg/mL abzudecken. Die zu analysierenden Proben wurden 1:50 mit Wasser verdünnt. Jeweils 25 µL Probe wurde pro Kavität in einer transparenten 96-Kavitäten Platte als Doppelbestimmung vorgelegt. Es wurde 1 Volumenteil Kupfer-II-Sulfat mit 49 Volumenteilen Bicinchoninsäure-Lösung (Sigma) vermischt. Anschließend wurden 200 µL des BCA-Reagenzes zu jeder Kavität gegeben und die Platte 30 min bei 37 °C inkubiert. Es bildete sich ein violetter Farbkomplex, der bei einer Wellenlänge von 550 nm spektralphotometrisch quantifiziert wurde.

#### **6.4.8 Bestimmung der Cyp27a1-Konzentration mittels ELISA**

Es erfolgte die Bestimmung der Cyp27a1-Konzentration im Lebergewebe nach Herstellerprotokoll des *Mouse Cyp27a1 ELISA Kits* (Abbexa Ltd.). Es wurden Doppelbestimmungen mit 2,5 µg Gesamtproteineinsatz pro Kavität der ELISA-Platte durchgeführt. Die Proben wurden mit DPBS (1x) verdünnt. Die Farbentwicklung erfolgte 15 min bei 37 °C unter Lichtausschluss. Die Reaktion wurde mit 50 µL Schwefelsäure gestoppt und der Farbumschlag bei einer Wellenlänge von 450 nm spektralphotometrisch detektiert.

### 6.4.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Es wurden ca. 200 mg gefrorenes Lebergewebe in 600 µL kaltem Lysepuffer, abgefüllt in 2 mL Lysing Matrix D Gefäße, gegeben und mit Hilfe des MagNALysers (Roche) für 20 sec bei einer Geschwindigkeit von 5500 rpm zerkleinert. Das homogenisierte Gewebe wurde dann 30 min bei 4 °C und 10 000 x g zentrifugiert. Es wurde eine Konzentrationsbestimmung des Gesamtproteingehaltes mittels BCA-Test vorgenommen bei einer Probenverdünnung von 1:40. Es wurden 40 µg Gesamtprotein jeder Probe mit Tris-Glycin SDS Probenpuffer (2x) und reduzierendem Agens (10x) vermischt und 2 min bei 85 °C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Die Trennung der Proteine erfolgte in einem 8-16 %igen Tris-Glycin-Gradientengel. Die Elektrophorese wurde mit dem Tris-Glycin-Laufpuffersystem bei einer Spannung von 225 V für 50 min durchgeführt. Nach der Separation der Proteine wurde das Gel kurz im Tris-Glycin Transferpuffer (10 % Methanol) equilibriert.

### 6.4.10 Western-Blot-Analyse

Zur Durchführung der *Western-Blot*-Analyse wurde die Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran für 30 sec in Methanol aktiviert, anschließend mit Wasser gespült und in Tris-Glycin-Transferpuffer bis zum weiteren Gebrauch gelagert. Die Proteine aus dem Acrylamid-Gel wurden mittels Nassblot-Verfahren auf eine PVDF-Membran bei 25 V für 1,5 h transferiert. Im Anschluss wurden die Proteine mit einer 3 %igen TCA-Lösung für 3 min auf der Membran fixiert. Die Membran wurde mit TBS-T-Puffer gewaschen und anschließend freie Bindungsstellen mit einer 5 %igen Magermilchpulver-TBS-T-Lösung für 1 h bei RT blockiert. Zur Detektion des Abcc6-Proteins wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in einer TBS-T-Lösung mit einem spezifischen primären Antikörper (1:2000) und danach in einer TBS-T-Lösung mit einem sekundären Peroxidase-gekoppelten-Antikörper (1:10 000) für 1 h bei RT inkubiert. Die Membran wurde schließlich 3 min mit AceGlow-Lösung inkubiert und die Chemilumineszenz am UV-Transilluminator Infinity 3000 (Peglab Biotechnologie GmbH) sichtbar gemacht und aufgenommen.

## 6.5 Histologische Methoden

### 6.5.1 Anfertigung von Gefrierschnitten

Zur histologischen Untersuchung wurden die entnommenen Vibrissen mit kryogenem Einbettmedium in einem Kryomolschälchen überschichtet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das eingebettete Gewebe wurde auf den Metallprobenstempel mittels Einbettmedium fixiert. Die Schnitte wurden bei einer Temperatur von -18 °C am Kryostat bei



einer Schnittdicke von 5 µm angefertigt und auf adhäsiv-beschichtete Objektträger transferiert, bei RT getrocknet und bis zur Färbung bei -20 °C gelagert.

### 6.5.2 Alizarin-Rot-Färbung

Die Schnitte wurden für 20 min bei RT aufgetaut und für 2 min in Alizarin-Rot-Lösung inkubiert. Es folgten zwei Waschungen mit Aqua dest. für jeweils 2 min. Die Präparate wurden zweimal in 99,5 %igem Isopropanol getaucht und zweimal für 2 min in *Roticlear* geklärt und anschließend in *Rotimount* eingedeckt. Die lichtmikroskopische Analyse der gefärbten Gefrierschnitte wurde mit dem Mikroskop Nikon Eclipse TE2000-S (Nikon Instruments, Düsseldorf) durchgeführt.

## 6.6 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine Methode zur Ermittlung der Molekülmasse und der Häufigkeit von geladenen Teilchen. Die Massenspektrometrie wird zur Identifizierung und zur quantitativen Erfassung von ausgewählten Analyten in komplexen Stoffgemischen oder zur Strukturaufklärung genutzt. Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor. Nach Ionisierung der Analyten werden diese im Analysator nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis aufgetrennt und detektiert.

Die massenspektrometrischen Analysen der Apolipoproteine und der Sterine im Serum von Wt- und *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen inklusive der Probenvorbereitung wurden im Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik des Universitätsklinikums Leipzig unter der Leitung von Frau Prof. Dr. rer. nat. Uta Ceglarek durchgeführt [370–372].

### 6.6.1 Bestimmung der Apolipoproteine im Serum mittels Mikro-LC-MS/MS Methode

Die Probenaufarbeitung der Seren zur Apolipoprotein-Bestimmung beinhaltete die Verdünnung der Proben mit internem Standard, einen Denaturierungs- und Reduktionsschritt sowie eine Alkylierung, einen tryptischen Verdauungsschritt und das Entsalzen der Peptide. Die Mikro-Flüssigchromatographie (LC)-Anlage bestand aus einem Ultimate 3000 RSLCnano System, einer Ultimate 3000 TCC-3000SD thermostatisierten Standard-Säulenkammer und einem Ultimate 3000 RS *Autosampler* (Thermo Fisher). Die LC-Anlage war gekoppelt mit einem Hybridanalysator, der einen Triple Quadrupol (QQQ)-Analysator und eine Lineare Ionenfalle (LIT) umfasste (QTRAP 5500 LC-MS/MS System, AB Sciex Germany GmbH, Darmstadt). Dieses war mit einer TurboV-Ionenquelle ausgestattet. Die chromatographische Trennung wurde mit Hilfe einer ZORBAX 300SB-C18

Säule (0,1 x 150 mm, 3,5 µm) bei 40 °C durchgeführt. Der *Autosampler* injizierte ein Probenvolumen von 1 µL. Die mobile Phase setzte sich aus einer Phase A (0,1 % Ameisensäure (Sigma-Aldrich) in Wasser/Methanol (90:10; v/v)) und einer Phase B (0,1 % Ameisensäure in Wasser/Methanol (10:90; v/v)) zusammen. Um die Separation zu verbessern, wird die prozentuale Zusammensetzung der mobilen Phase während eines jeden Durchlaufs variiert mittels linearer Erhöhung der Phase B von 20 % zu 100 % in 3,5 min. 100 % Phase B wurde bis Minute 6,5 gehalten und äquilibriert von Minute 6,6 bis Minute 7,6 mit 20 % Phase B. Die Flussrate betrug 50 µL/min. Der QTRAP arbeitete im positiven Ionenmodus mit einer Spannung von 5500 V und einer Temperatur von 400 °C, Gasquelle 1 = 20 psi, Gasquelle 2 = 50 psi [371]. Die Datenprozessierung wurde mit der AB Sciex Software MultiQuant 2,0 durchgeführt und die ApoA-I-, ApoA-II-, ApoA-IV-, ApoB-, ApoC-I- und ApoE-Konzentrationen (µmol/L) im Serum von 6 Monate und 12 Monate alten Wt- und Abcc6-defizienten Mäusen erfasst.

#### **6.6.2 Bestimmung der Konzentration von freien und veresterten Sterinen mittels APPI-LC-MS/MS Methode**

Zur Quantifizierung von freien und veresterten Steroide wurden 20 µL Serum mit 980 µL interner Standardlösung verdünnt, für 10 min bei 11 400 x g zentrifugiert und in ein Glas-*Vial* transferiert. Die Proben wurden mit 2 mL ethanolischer Natriumhydroxid-Lösung (1 M) gemischt und 1 h bei 68 °C hydrolysiert. Anschließend wurde 1 mL deionisiertes Wasser zugegeben und die Proben mittels 3 mL Cyclohexan extrahiert. Die Probe wurde bei 65 °C unter einem Stickstoffstrahl getrocknet und anschließend mit 200 µL Isopropanol rekonstituiert.

Die chromatographische Anlage bestand aus einer thermostatisierten Säulenkammer und einem *Series 200 Autosampler* und einem binärem Mikro-Pumpsystem (Perkin Elmer, Rotgau-Jügesheim). Die LC-Anlage war gekoppelt mit einem MDS Sciex API 3000 Triple Quadrupol-Massenspektrometer System (AB Sciex Germany GmbH), welches eine Atmosphärendruck-Photoionisationsquelle (*atmospheric pressure photoionization*, APPI) enthielt. Die chromatographische Trennung wurde mit Hilfe einer Chromolith SpeedRod RP-18endcapped 50 - 4.6 Säule (Merck) bei 40 °C durchgeführt. Der *Autosampler* injizierte ein Probenvolumen von 25 µL. Die Säule wurde für 1 min mit einer Methanol-Wasser-Lösung (75:25; v/v) bei einer Flussrate von 600 µL/min äquilibriert. Um die Separation zu verbessern, wird die prozentuale Zusammensetzung der mobilen Phase während eines jeden Durchlaufs durch eine lineare Erhöhung der Isopropanol-Konzentration auf 100 % variiert. Diese Bedingungen wurden bis Minute 3,5 aufrechterhalten. Nach dem Durchlauf wurde die Säule für 4,5 min mit einer Methanol-Wasser-Lösung (75:25; v/v) äquilibriert. Die Photospray-Ionenquelle des MDS Sciex Api 3000

QTRAP Systems arbeitete im positiven Ionenmodus mit einer Brennspannung von 1700 V und einer Wechselstromspannung von 45 V bei einer Temperatur von 400 °C [370]. Ermittelt wurden die freie, die veresterte und die totale Konzentration von Brassicasterin, Campesterin, Stigmasterin, Sitosterin, Lanosterin, Cholesterin und Desmosterin (mg/mL) im Serum 6 Monate und 12 Monate alter Wt- und Abcc6-defizienter Mäuse.

## **6.7 Statistische Analysen**

Mit Hilfe des Statistik-Programms Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc.) wurden die statistischen Analysen vorgenommen. Durch Anwendung des Shapiro-Wilk-Tests wurde geprüft, ob die Daten normalverteilt sind. Für Vergleiche von zwei Gruppen wurden die statistischen Signifikanzen unter Verwendung des zweiseitigen, ungepaarten t-Tests ermittelt. Für Vergleiche von mehr als zwei Gruppen wurden die einfaktorielle Varianzanalyse und die Bonferroni-Korrektur als Post-hoc-Test eingesetzt. Bei  $p < 0,05$  wurde eine statistische Signifikanz angenommen.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Temperatur in Grad Celsius
μ	Mikro
Abb.	Abbildung
Abcc6	Adenosintriphosphat-Bindungskassetten-Transporter, Unterfamilie C, Mitglied 6
<i>Abcc6<sup>-/-</sup></i>	<i>Abcc6-Knockout</i>
Apo	Apolipoprotein
bp	Basenpaar
ca.	<i>circa</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CM	Chylomikronen
C <sub>T</sub>	<i>Cycle Threshold</i> (Schwellenwert-Zyklus)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<i>et al.</i>	und Andere
EtBr	Ethidiumbromid (500 μg/mL)
g	Erdbeschleunigung
h	hour (Stunde)
HDL	<i>High-density lipoproteins</i>
IDL	<i>Intermediate-density lipoproteins</i>
LDL/VLDL	<i>Low-density lipoproteins/Very low-density lipoproteins</i>
min	Minute
mRNA	Messenger Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
DPBS	Dulbeccos phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	Negative dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PXE	Pseudoxanthoma elasticum
qPCR	Quantitative <i>real-time</i> PCR
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
Wt	Wildtyp

## 8 Referenzen

- [1] K.H. Neldner, Pseudoxanthoma elasticum, *International Journal of Dermatology*, 27 (1988) 98–100.
- [2] M.J. Hosen, A. Lamoën, A. De Paepe, O.M. Vanakker, Histopathology of pseudoxanthoma elasticum and related disorders: histological hallmarks and diagnostic clues, *Scientifica*, (2012).
- [3] D. Gheduzzi, R. Sammarco, D. Quaglino, L. Bercovitch, S. Terry, W. Taylor, I.P. Ronchetti, Extracutaneous ultrastructural alterations in pseudoxanthoma elasticum, *Ultrastructural Pathology*, 27 (2003) 375–384.
- [4] M. Baccarani-Contrì, D. Vincenzi, F. Cicchetti, G. Mori, I. Pasquali-Ronchetti, Immunochemical identification of abnormal constituents in the dermis of pseudoxanthoma elasticum patients, *European Journal of Histochemistry: EJH*, 38 (1994) 111–123.
- [5] N. Chassaing, L. Martin, P. Calvas, M. Le Bert, A. Hovnanian, Pseudoxanthoma elasticum: a clinical, pathophysiological and genetic update including 11 novel ABCC6 mutations, *Journal of Medical Genetics*, 42 (2005) 881–892.
- [6] L. Martin, F. Maitre, P. Bonicel, P. Daudon, C. Verny, D. Bonneau, O. Le Saux, N. Chassaing, Heterozygosity for a single mutation in the ABCC6 gene may closely mimic PXE: consequences of this phenotype overlap for the definition of PXE, *Archives of Dermatology*, 144 (2008) 301–306.
- [7] E.G. Pfendner, O.M. Vanakker, S.F. Terry, S. Vourthis, P.E. McAndrew, M.R. McClain, S. Fratta, A.-S. Marais, S. Hariri, P.J. Coucke, others, Mutation detection in the ABCC6 gene and genotype-phenotype analysis in a large international case series affected by pseudoxanthoma elasticum, *Journal of Medical Genetics*, 44 (2007) 621–628.
- [8] B. Struk, K.H. Neldner, V.S. Rao, P. St Jean, K. Lindpaintner, Mapping of both autosomal recessive and dominant variants of pseudoxanthoma elasticum to chromosome 16p13.1, *Human Molecular Genetics*, 6 (1997) 1823–1828.
- [9] A.A. Bergen, A.S. Plomp, E.J. Schuurman, S. Terry, M. Breuning, H. Dauwerse, J. Swart, M. Kool, S. van Soest, F. Baas, others, Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum, *Nature Genetics*, 25 (2000) 228.
- [10] O. Le Saux, Z. Urban, C. Tschuch, K. Csiszar, B. Bacchelli, D. Quaglino, I. Pasquali-Ronchetti, F.M. Pope, A. Richards, S. Terry, others, Mutations in a gene encoding an ABC transporter cause pseudoxanthoma elasticum, *Nature Genetics*, 25 (2000) 223–227.
- [11] F. Ringpfeil, M.G. Lebowitz, A.M. Christiano, J. Uitto, Pseudoxanthoma elasticum: mutations in the MRP6 gene encoding a transmembrane ATP-binding cassette (ABC) transporter, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (2000) 6001–6006.
- [12] D.P. Germain, Pseudoxanthoma elasticum, *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 12 (2017) 85.
- [13] L. Pulkkinen, A. Nakano, F. Ringpfeil, J. Uitto, Identification of ABCC6 pseudogenes on human chromosome 16p: implications for mutation detection in pseudoxanthoma elasticum, *Human Genetics*, 109 (2001) 356–365.
- [14] L. Cai, B. Struk, M.D. Adams, W. Ji, T. Haaf, H.-L. Kang, S.H. Dho, X. Xu, F. Ringpfeil, J. Nancarrow, others, A 500-kb region on chromosome 16p13.1 contains the pseudoxanthoma elasticum locus: high-resolution mapping and genomic structure, *Journal of Molecular Medicine*, 78 (2000) 36–46.

- [15] X. Hu, A.S. Plomp, S. van Soest, J. Wijnholds, P.T. de Jong, A.A. Bergen, Pseudoxanthoma elasticum: a clinical, histopathological, and molecular update, *Survey of Ophthalmology*, 48 (2003) 424–438.
- [16] O.M. Vanakker, M.J. Hosen, A. De Paepe, The ABCC6 transporter: what lessons can be learnt from other ATP-binding cassette transporters?, *Frontiers in Genetics*, 4 (2013).
- [17] M.J. Hosen, A. Zubaer, S. Thapa, B. Khadka, A. De Paepe, O.M. Vanakker, Molecular docking simulations provide insights in the substrate binding sites and possible substrates of the ABCC6 transporter, *PloS One*, 9 (2014) e102779.
- [18] M. Naouri, C. Boisseau, P. Bonicel, P. Daudon, D. Bonneau, N. Chassaing, L. Martin, Manifestations of pseudoxanthoma elasticum in childhood, *British Journal of Dermatology*, 161 (2009) 635–639.
- [19] B. Marconi, I. Bobyr, A. Campanati, E. Molinelli, V. Consales, V. Brisigotti, M. Scarpelli, S. Racchini, A. Offidani, Pseudoxanthoma elasticum and skin: Clinical manifestations, histopathology, pathomechanism, perspectives of treatment, *Intractable \& Rare Diseases Research*, 4 (2015) 113–122.
- [20] A.S. Plomp, J. Toonstra, A.A. Bergen, M.R. van Dijk, P.T. de Jong, Proposal for updating the pseudoxanthoma elasticum classification system and a review of the clinical findings, *American Journal of Medical Genetics Part A*, 152 (2010) 1049–1058.
- [21] J. Uitto, Q. Li, Q. Jiang, Pseudoxanthoma elasticum: molecular genetics and putative pathomechanisms, *Journal of Investigative Dermatology*, 130 (2010) 661–670.
- [22] I. Georgalas, I. Tservakis, D. Papaconstantinou, M. Kardara, C. Koutsandrea, I. Ladas, Pseudoxanthoma elasticum, ocular manifestations, complications and treatment, *Clinical and Experimental Optometry*, 94 (2011) 169–180.
- [23] R. Dreyer, The pathology of angioid streaks: a study of twenty-one cases, *Trans Penn Acad Ophthalmol Otolaryngol*, 31 (1978) 158–167.
- [24] M. Gliem, J. De Zaeytijd, R.P. Finger, F.G. Holz, B.P. Leroy, P. Charbel Issa, An update on the ocular phenotype in patients with pseudoxanthoma elasticum, *Frontiers in Genetics*, 4 (2013) 14.
- [25] G. Lefthériotis, L. Omarjee, O. Le Saux, D. Henrion, P. Abraham, F. Prunier, S. Willoteaux, L. Martin, The vascular phenotype in Pseudoxanthoma elasticum and related disorders: contribution of a genetic disease to the understanding of vascular calcification, *Frontiers in Genetics*, 4 (2013) 4.
- [26] G. Kranenburg, P.A. de Jong, W.P. Mali, M. Attrach, F.L. Visseren, W. Spiering, Prevalence and severity of arterial calcifications in pseudoxanthoma elasticum (PXE) compared to hospital controls Novel insights into the vascular phenotype of PXE, *Atherosclerosis*, 256 (2017) 7–14.
- [27] O.M. Vanakker, B.P. Leroy, P. Coucke, L.G. Bercovitch, J. Uitto, D. Viljoen, S.F. Terry, P. Van Acker, D. Matthys, B. Loeys, others, Novel clinico-molecular insights in pseudoxanthoma elasticum provide an efficient molecular screening method and a comprehensive diagnostic flowchart, *Human Mutation*, 29 (2008) 205–205.
- [28] M.E. Gonzalez, H.J. Votava, G. Lipkin, M. Sanchez, Pseudoxanthoma elasticum, *Dermatology Online Journal*, 15 (2009).
- [29] D. Quagliano, F. Boraldi, G. Annovi, I. Ronchetti, The multifaceted complexity of genetic diseases: a lesson from pseudoxanthoma elasticum, in: *Advances in the Study of Genetic Disorders*, InTech, 2011.

- [30] G. Crespi, L.E. Derchi, S. Saffioti, Sonographic detection of renal changes in pseudoxanthoma elasticum, *Urologic Radiology*, 13 (1991) 223.
- [31] O. Vanakker, D. Voet, M. Petrovic, F. Van Robaeys, B. Leroy, P. Coucke, A. De Paepe, Visceral and testicular calcifications as part of the phenotype in pseudoxanthoma elasticum: ultrasound findings in Belgian patients and healthy carriers, *The British Journal of Radiology*, 79 (2006) 221–225.
- [32] L. Bercovitch, B. Schepps, S. Koelliker, C. Magro, S. Terry, M. Lebwohl, Mammographic findings in pseudoxanthoma elasticum, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 48 (2003) 359–366.
- [33] W.L. Lau, S. Liu, N.D. Vaziri, Chronic kidney disease results in deficiency of ABCC6, the novel inhibitor of vascular calcification, *American Journal of Nephrology*, 40 (2014) 51–55.
- [34] B. Fabre, P. Bayle, J. Bazex, D. Durand, L. Lamant, N. Chassaing, Pseudoxanthoma elasticum and nephrolithiasis, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 19 (2005) 212–215.
- [35] I. ul H. Arfan-ul-Bari, M. Rani, A. Nadeem, M.A. Taj, Pseudoxanthoma elasticum and nephrolithiasis: A rare association, *JCPSP*, 17 (2007) 686–688.
- [36] J. Uitto, L. Pulkkinen, F. Ringpfeil, Molecular genetics of pseudoxanthoma elasticum: a metabolic disorder at the environment-genome interface?, *Trends in Molecular Medicine*, 7 (2001) 13–17.
- [37] G.L. Scheffer, X. Hu, A.C. Pijnenborg, J. Wijnholds, A.A. Bergen, R.J. Scheper, MRP6 (ABCC6) detection in normal human tissues and tumors, *Laboratory Investigation*, 82 (2002) 515.
- [38] M. Kool, M. Van Der Linden, M. De Haas, F. Baas, P. Borst, Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells, *Cancer Research*, 59 (1999) 175–182.
- [39] T.G.M.F. Gorgels, X. Hu, G.L. Scheffer, A.C. van der Wal, J. Toonstra, P.T.V.M. de Jong, T.H. van Kuppevelt, C.N. Levelt, A. de Wolf, W.J.P. Loves, R.J. Scheper, R. Peek, A.A.B. Bergen, Disruption of Abcc6 in the mouse: novel insight in the pathogenesis of pseudoxanthoma elasticum, *Hum. Mol. Genet.*, 14 (2005) 1763–73.
- [40] J.M. Maher, A.L. Slitt, N.J. Cherrington, X. Cheng, C.D. Klaassen, Tissue distribution and hepatic and renal ontogeny of the multidrug resistance-associated protein (Mrp) family in mice, *Drug Metabolism and Disposition*, (2005).
- [41] R.P. Finger, P.C. Issa, M.S. Ladewig, C. Götting, C. Szliska, H.P. Scholl, F.G. Holz, Pseudoxanthoma elasticum: genetics, clinical manifestations and therapeutic approaches, *Survey of Ophthalmology*, 54 (2009) 272–285.
- [42] A.A. Bergen, A.S. Plomp, X. Hu, P.T. de Jong, T.G. Gorgels, ABCC6 and pseudoxanthoma elasticum, *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 453 (2007) 685–691.
- [43] D. Hendig, T. Langmann, S. Kocken, R. Zarbock, C. Szliska, G. Schmitz, K. Kleesiek, C. Götting, Gene expression profiling of ABC transporters in dermal fibroblasts of pseudoxanthoma elasticum patients identifies new candidates involved in PXE pathogenesis, *Laboratory Investigation*, 88 (2008) 1303–1315.
- [44] W. Jahn-Dechent, A. Heiss, C. Schäfer, M. Ketteler, Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism, *Circulation Research*, 108 (2011) 1494–1509.

- [45] G. Luo, P. Ducky, M.D. McKee, G.J. Pinero, E. Loyer, R.R. Behringer, G. Karsenty, Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein, *Nature*, 386 (1997) 78.
- [46] D. Hendig, V. Schulz, M. Arndt, C. Szliska, K. Kleesiek, C. Götting, Role of serum fetuin-A, a major inhibitor of systemic calcification, in pseudoxanthoma elasticum, *Clinical Chemistry*, 52 (2006) 227–234.
- [47] D. Hendig, R. Zarbock, C. Szliska, K. Kleesiek, C. Götting, The local calcification inhibitor matrix Gla protein in pseudoxanthoma elasticum, *Clinical Biochemistry*, 41 (2008) 407–412.
- [48] O. Le Saux, S. Bunda, C.M. VanWart, V. Douet, L. Got, L. Martin, A. Hinek, Serum factors from pseudoxanthoma elasticum patients alter elastic fiber formation in vitro, *Journal of Investigative Dermatology*, 126 (2006) 1497–1505.
- [49] Q. Jiang, R. Oldenburg, S. Otsuru, A.E. Grand-Pierre, E.M. Horwitz, J. Uitto, Parabiotic heterogenetic pairing of *Abcc6*<sup>-/-</sup>*Rag1*<sup>-/-</sup> mice and their wild-type counterparts halts ectopic mineralization in a murine model of pseudoxanthoma elasticum, *The American Journal of Pathology*, 176 (2010) 1855–1862.
- [50] D. Quaglini Jr, F. Boraldi, D. Barbieri, A. Croce, R. Tiozzo, I.P. Ronchetti, Abnormal phenotype of in vitro dermal fibroblasts from patients with pseudoxanthoma elasticum (PXE), *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1501 (2000) 51–62.
- [51] A. Passi, R. Albertini, M.B. Contri, G. De Luca, A. De Paepe, G. Pallavicini, I.P. Ronchetti, R. Tiozzo, Proteoglycan alterations in skin fibroblast cultures from patients affected with pseudoxanthoma elasticum, *Cell Biochemistry and Function*, 14 (1996) 111–120.
- [52] D. Quaglini, L. Sartor, S. Garbisa, F. Boraldi, A. Croce, A. Passi, G. De Luca, R. Tiozzo, I. Pasquali-Ronchetti, Dermal fibroblasts from pseudoxanthoma elasticum patients have raised MMP-2 degradative potential, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1741 (2005) 42–47.
- [53] J. Uitto, J. Paul, K. Brockley, R. Pearce, J. Clark, Elastic fibers in human skin: quantitation of elastic fibers by computerized digital image analyses and determination of elastin by radioimmunoassay of desmosine, *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 49 (1983) 499–505.
- [54] U. Diekmann, R. Zarbock, D. Hendig, C. Szliska, K. Kleesiek, C. Götting, Elevated circulating levels of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in pseudoxanthoma elasticum patients, *Journal of Molecular Medicine*, 87 (2009) 965.
- [55] L. Annovazzi, S. Viglio, D. Gheduzzi, I. Pasquali-Ronchetti, C. Zanone, G. Cetta, P. Iadarola, High levels of desmosines in urine and plasma of patients with pseudoxanthoma elasticum, *European Journal of Clinical Investigation*, 34 (2004) 156–164.
- [56] M. Lebwohl, E. Schwartz, G. Lemlich, O. Lovelace, F. Shaikh-Bahai, R. Fleischmajer, Abnormalities of connective tissue components in lesional and non-lesional tissue of patients with pseudoxanthoma elasticum, *Archives of Dermatological Research*, 285 (1993) 121–126.
- [57] K. Sakuraoaka, S. Tajima, T. Nishikawa, Y. Seyama, Biochemical analyses of macromolecular matrix components in patients with pseudoxanthoma elasticum, *The Journal of Dermatology*, 21 (1994) 98–101.
- [58] J.F. Klement, Y. Matsuzaki, Q.-J. Jiang, J. Terlizzi, H.Y. Choi, N. Fujimoto, K. Li, L. Pulkkinen, D.E. Birk, J.P. Sundberg, J. Uitto, Targeted ablation of the *abcc6* gene results in ectopic mineralization of connective tissues, *Mol. Cell. Biol.*, 25 (2005) 8299–310.



- [59] M. Suarez, J. Garcia, M. Orense, E. Raimunde, M. Lopez, O. Fernandez, Sonographic aspects of pseudoxanthoma elasticum, *Pediatric Radiology*, 21 (1991) 538–539.
- [60] A. Sapadin, M. Lebwohl, S. Teich, R. Phelps, D. DiCostanzo, S. Cohen, Periumbilical pseudoxanthoma elasticum associated with chronic renal failure and angioid streaks—apparent regression with hemodialysis, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 39 (1998) 338–344.
- [61] T.G. Gorgels, P. Teeling, J.D. Meeldijk, S.T. Nillesen, A.C. van der Wal, T.H. van Kuppevelt, A.A. Bergen, Abcc6 deficiency in the mouse leads to calcification of collagen fibers in Bruch's membrane, *Experimental Eye Research*, 104 (2012) 59–64.
- [62] O. Jensen, Bruch's membrane in pseudoxanthoma elasticum, *Albrecht von Graefes Archiv Für Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie*, 203 (1977) 311–320.
- [63] J.C. Booij, D.C. Baas, J. Beisekeeva, T.G. Gorgels, A.A. Bergen, The dynamic nature of Bruch's membrane, *Progress in Retinal and Eye Research*, 29 (2010) 1–18.
- [64] J. Wang, S. Near, K. Young, P.W. Connelly, R.A. Hegele, ABCC6 gene polymorphism associated with variation in plasma lipoproteins, *Journal of Human Genetics*, 46 (2001) 699.
- [65] D.P. Germain, J. Perdu, V. Remones, X. Jeunemaitre, Homozygosity for the R1268Q mutation in MRP6, the pseudoxanthoma elasticum gene, is not disease-causing, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 274 (2000) 297–301.
- [66] V. Schulz, D. Hendig, M. Henjakovic, C. Szliska, K. Kleesiek, C. Götting, Mutational analysis of the ABCC6 gene and the proximal ABCC6 gene promoter in German patients with pseudoxanthoma elasticum (PXE), *Human Mutation*, 27 (2006) 831–831.
- [67] G.M. Peloso, S. Demissie, D. Collins, D.B. Mirel, S.B. Gabriel, L.A. Cupples, S.J. Robins, E.J. Schaefer, M.E. Brousseau, Common genetic variation in multiple metabolic pathways influences susceptibility to low HDL-cholesterol and coronary heart disease, *Journal of Lipid Research*, 51 (2010) 3524–3532.
- [68] M.D. Trip, Y.M. Smulders, J.J. Wegman, X. Hu, J.M. Boer, B. Jacoline, A.H. Zwinderman, J.J. Kastelein, E.J. Feskens, A.A. Bergen, Frequent mutation in the ABCC6 gene (R1141X) is associated with a strong increase in the prevalence of coronary artery disease, *Circulation*, 106 (2002) 773–775.
- [69] H. Guo, Q. Li, D.W. Chou, J. Uitto, Atorvastatin counteracts aberrant soft tissue mineralization in a mouse model of pseudoxanthoma elasticum (Abcc6<sup>-/-</sup>), *Journal of Molecular Medicine*, 91 (2013) 1177–1184.
- [70] P. Kuzaj, J. Kuhn, R.D. Michalek, E.D. Karoly, I. Faust, M. Dabisch-Ruthe, C. Knabbe, D. Hendig, Large-scaled metabolic profiling of human dermal fibroblasts derived from pseudoxanthoma elasticum patients and healthy controls, *PloS One*, 9 (2014) e108336.
- [71] V. Douet, C.M. VanWart, M.B. Heller, S. Reinhard, O. Le Saux, HNF4alpha and NF-E2 are key transcriptional regulators of the murine Abcc6 gene expression, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1759 (2006) 426–436.
- [72] H. De Boussac, M. Ratajewski, I. Sachrajda, G. Köblös, A. Tordai, L. Pulaski, L. Buday, A. Váradi, T. Arányi, The ERK1/2-hepatocyte nuclear factor 4alpha axis regulates human ABCC6 gene expression in hepatocytes, *Journal of Biological Chemistry*, 285 (2010) 22800–22808.
- [73] G.P. Hayhurst, Y.-H. Lee, G. Lambert, J.M. Ward, F.J. Gonzalez, Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis, *Molecular and Cellular Biology*, 21 (2001) 1393–1403.

- [74] D.B. Jump, D. Botolin, Y. Wang, J. Xu, B. Christian, O. Demeure, Fatty acid regulation of hepatic gene transcription, *The Journal of Nutrition*, 135 (2005) 2503–2506.
- [75] K. Simons, E. Ikonen, Functional rafts in cell membranes, *Nature*, 387 (1997) 569.
- [76] G.P. Hooff, W.G. Wood, W.E. Müller, G.P. Eckert, Isoprenoids, small GTPases and Alzheimer's disease, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801 (2010) 896–905.
- [77] J. Pasqualini, Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 97 (2005) 401–415.
- [78] R.S. Kiss, A. Sniderman, Shunts, channels and lipoprotein endosomal traffic: a new model of cholesterol homeostasis in the hepatocyte, *Journal of Biomedical Research*, 31 (2017) 95.
- [79] J.M. Foody, Familial Hypercholesterolemia: An Under-recognized but Significant Concern in Cardiology Practice, *Clinical Cardiology*, 37 (2014) 119–125.
- [80] J.M. Dietschy, S.D. Turley, D.K. Spady, Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans, *Journal of Lipid Research*, 34 (1993) 1637–1659.
- [81] C. Martini, V. Pallottini, Cholesterol: from feeding to gene regulation, *Genes & Nutrition*, 2 (2007) 181–193.
- [82] S. Ghosh, Early steps in reverse cholesterol transport: cholesteryl ester hydrolase and other hydrolases, *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 19 (2012) 136–141.
- [83] L.J. Sharpe, A.J. Brown, Controlling cholesterol synthesis beyond 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR), *Journal of Biological Chemistry*, 288 (2013) 18707–18715.
- [84] S. Meaney, Epigenetic regulation of cholesterol homeostasis, *Frontiers in Genetics*, 5 (2014) 311.
- [85] M.S. Brown, J.L. Goldstein, Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's Meladl, *Journal of Lipid Research*, 50 (2009) 15–27.
- [86] M. Hashemi, R. Hoshyar, S. R Ande, Q.M. Chen, C. Solomon, A. Zuse, M. Naderi, Mevalonate cascade and its regulation in cholesterol metabolism in different tissues in health and disease, *Current Molecular Pharmacology*, 10 (2017) 13–26.
- [87] P. Bonetti, L.O. Lerman, C. Napoli, A. Lerman, Statin effects beyond lipid lowering-are they clinically relevant?, *European Heart Journal*, 24 (2003) 225–248.
- [88] P.A. Edwards, J. Ericsson, Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway, *Annual Review of Biochemistry*, 68 (1999) 157–185.
- [89] G. Gruenbacher, M. Thurnher, Mevalonate metabolism in cancer, *Cancer Letters*, 356 (2015) 192–196.
- [90] R. Do, R. Kiss, D. Gaudet, J. Engert, Squalene synthase: a critical enzyme in the cholesterol biosynthesis pathway, *Clinical Genetics*, 75 (2009) 19–29.
- [91] A.H. Rowe, C.A. Argmann, J.Y. Edwards, C.G. Sawyez, O.H. Morand, R.A. Hegele, M.W. Huff, Enhanced synthesis of the oxysterol 24 (S), 25-epoxycholesterol in macrophages by inhibitors of 2, 3-oxidosqualene: lanosterol cyclase: a novel mechanism for the attenuation of foam cell formation, *Circulation Research*, 93 (2003) 717–725.

- [92] F.D. Porter, G.E. Herman, Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis, *Journal of Lipid Research*, 52 (2011) 6–34.
- [93] J. Acimovic, D. Rozman, Steroidal triterpenes of cholesterol synthesis, *Molecules*, 18 (2013) 4002–4017.
- [94] F. Lammert, D.Q.-H. Wang, New insights into the genetic regulation of intestinal cholesterol absorption, *Gastroenterology*, 129 (2005) 718–734.
- [95] I. Ikeda, K. Tanaka, M. Sugano, G. Vahouny, L. Gallo, Inhibition of cholesterol absorption in rats by plant sterols, *Journal of Lipid Research*, 29 (1988) 1573–1582.
- [96] I.S. Chen, S.S. Hotta, I. Ikeda, M.M. Cassidy, A.J. Sheppard, G.V. Vahouny, Digestion, absorption and effects on cholesterol absorption of menhaden oil, fish oil concentrate and corn oil by rats, *The Journal of Nutrition*, 117 (1987) 1676–1680.
- [97] A.F. Hofmann, B. Borgstrom, Physico-chemical state of lipids in intestinal content during their digestion and absorption, in: *Federation Proceedings*, 1962: p. 43.
- [98] M. Siperstein, I. Chaikoff, W. Reinhardt, others, C14-Cholesterol 5 Obligatory function of bile in intestinal absorption of cholesterol, *Journal of Biological Chemistry*, 198 (1952) 111–114.
- [99] A. Hofmann, D. Small, Detergent properties of bile salts: correlation with physiological function, *Annual Review of Medicine*, 18 (1967) 333–376.
- [100] I. Ramasamy, Recent advances in physiological lipoprotein metabolism, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 52 (2014) 1695–1727.
- [101] E. Fisher, E. Lake, R.S. McLeod, Apolipoprotein B100 quality control and the regulation of hepatic very low density lipoprotein secretion, *Journal of Biomedical Research*, 28 (2014) 178.
- [102] J. Peng, F. Luo, G. Ruan, R. Peng, X. Li, Hypertriglyceridemia and atherosclerosis, *Lipids in Health and Disease*, 16 (2017) 233.
- [103] B. Sjouke, D. Kusters, J.J. Kastelein, G. Hovingh, Familial hypercholesterolemia: present and future management, *Current Cardiology Reports*, 13 (2011) 527.
- [104] L.W. Weber, M. Boll, A. Stampfl, Maintaining cholesterol homeostasis: sterol regulatory element-binding proteins, *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 10 (2004) 3081.
- [105] P. Nair, Brown and Goldstein: the cholesterol chronicles, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (2013) 14829–14832.
- [106] G. Go, A. Mani, Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis, *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 85 (2012) 19.
- [107] N.G. Seidah, The PCSK9 revolution and the potential of PCSK9-based therapies to reduce LDL-cholesterol, *Global Cardiology Science and Practice*, (2015) 59.
- [108] M.D. Shapiro, S. Fazio, H. Tavori, Targeting PCSK9 for therapeutic gains, *Current Atherosclerosis Reports*, 17 (2015) 19.
- [109] D.-W. Zhang, T.A. Lagace, R. Garuti, Z. Zhao, M. McDonald, J.D. Horton, J.C. Cohen, H.H. Hobbs, Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation, *Journal of Biological Chemistry*, 282 (2007) 18602–18612.

- [110] T.A. Lagace, D.E. Curtis, R. Garuti, M.C. McNutt, S.W. Park, H.B. Prather, N.N. Anderson, Y. Ho, R.E. Hammer, J.D. Horton, Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice, *The Journal of Clinical Investigation*, 116 (2006) 2995–3005.
- [111] N.G. Seidah, S. Benjannet, L. Wickham, J. Marcinkiewicz, S.B. Jasmin, S. Stifani, A. Basak, A. Prat, M. Chrétien, The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (2003) 928–933.
- [112] R. Ohashi, H. Mu, X. Wang, Q. Yao, C. Chen, Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis, *Qjm*, 98 (2005) 845–856.
- [113] K. Ono, Current concept of reverse cholesterol transport and novel strategy for atheroprotection, *Journal of Cardiology*, 60 (2012) 339–343.
- [114] E.A. Fisher, J.E. Feig, B. Hewing, S.L. Hazen, J.D. Smith, High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32 (2012) 2813–2820.
- [115] Á. Baldán, D.D. Bojanic, P.A. Edwards, The ABCs of sterol transport, *Journal of Lipid Research*, 50 (2009) 80–85.
- [116] D. Kielar, W. Dietmaier, T. Langmann, C. Aslanidis, M. Probst, M. Naruszewicz, G. Schmitz, Rapid quantification of human ABCA1 mRNA in various cell types and tissues by real-time reverse transcription-PCR, *Clinical Chemistry*, 47 (2001) 2089–2097.
- [117] R.R. Singaraja, M. Van Eck, N. Bissada, F. Zimetti, H.L. Collins, R.B. Hildebrand, A. Hayden, L.R. Brunham, M.H. Kang, J.-C. Fruchart, others, Both hepatic and extrahepatic ABCA1 have discrete and essential functions in the maintenance of plasma high-density lipoprotein cholesterol levels in vivo, *Circulation*, 114 (2006) 1301–1309.
- [118] D.J. Rader, K. Ikewaki, N. Duverger, H. Schmidt, H. Pritchard, J. Frohlich, M. Clerc, M. Dumon, T. Fairwell, L. Zech, Markedly accelerated catabolism of apolipoprotein A-II (ApoA-II) and high density lipoproteins containing ApoA-II in classic lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency and fish-eye disease, *The Journal of Clinical Investigation*, 93 (1994) 321–330.
- [119] A.M. Vaughan, J.F. Oram, ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by high density lipoprotein but not by lipid-depleted apolipoproteins, *Journal of Biological Chemistry*, 280 (2005) 30150–30157.
- [120] J.F. Oram, A.M. Vaughan, ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease, *Circulation Research*, 99 (2006) 1031–1043.
- [121] V.I. Zannis, A. Chroni, M. Krieger, Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL, *Journal of Molecular Medicine*, 84 (2006) 276–294.
- [122] L.-H. Huang, A. Elvington, G.J. Randolph, The role of the lymphatic system in cholesterol transport, *Frontiers in Pharmacology*, 6 (2015) 182.
- [123] C. Glass, R.C. Pittman, D.B. Weinstein, D. Steinberg, Dissociation of tissue uptake of cholesterol ester from that of apoprotein AI of rat plasma high density lipoprotein: selective delivery of cholesterol ester to liver, adrenal, and gonad, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80 (1983) 5435–5439.
- [124] Y. Ji, N. Wang, R. Ramakrishnan, E. Sehayek, D. Huszar, J.L. Breslow, A.R. Tall, Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile, *Journal of Biological Chemistry*, 274 (1999) 33398–33402.

- [125] K.F. Kozarsky, M.H. Donahee, A. Rigotti, S.N. Iqbal, E.R. Edelman, M. Krieger, Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels, *Nature*, 387 (1997) 414.
- [126] C.J. Harder, A. Meng, P. Rippstein, H.M. McBride, R. McPherson, SR-BI undergoes cholesterol-stimulated transcytosis to the bile canaliculus in polarized WIF-B cells, *Journal of Biological Chemistry*, 282 (2007) 1445–1455.
- [127] I. Voloshyna, A.B. Reiss, The ABC transporters in lipid flux and atherosclerosis, *Progress in Lipid Research*, 50 (2011) 213–224.
- [128] A. Wächtershäuser, J. Stein, Lipid-und Lipoproteinstoffwechsel: Physiologie und Pathophysiologie, *Pharmazie in Unserer Zeit*, 36 (2007) 98–107.
- [129] D. Nedelkov, Mass Spectrometric Studies of Apolipoprotein Proteoforms and Their Role in Lipid Metabolism and Type 2 Diabetes, *Proteomes*, 5 (2017) 27.
- [130] B.F. Asztalos, E.J. Schaefer, HDL in atherosclerosis: actor or bystander?, *Atherosclerosis Supplements*, 4 (2003) 21–29.
- [131] A.S. Shah, L. Tan, J.L. Long, W.S. Davidson, Proteomic diversity of high density lipoproteins: our emerging understanding of its importance in lipid transport and beyond, *Journal of Lipid Research*, 54 (2013) 2575–2585.
- [132] P. Duriez, J. Fruchart, High-density lipoprotein subclasses and apolipoprotein AI, *Clinica Chimica Acta*, 286 (1999) 97–114.
- [133] T. Kalogeris, K. Fukagawa, P. Tso, Synthesis and lymphatic transport of intestinal apolipoprotein A-IV in response to graded doses of triglyceride, *Journal of Lipid Research*, 35 (1994) 1141–1151.
- [134] A. Kontush, M. Lindahl, M. Lhomme, L. Calabresi, M.J. Chapman, W.S. Davidson, Structure of HDL: particle subclasses and molecular components, in: *High Density Lipoproteins*, Springer, (2015) 3–51.
- [135] A.G. Holleboom, H. Karlsson, R.-S. Lin, T.M. Beres, J.A. Sierts, D.S. Herman, E.S. Stroes, J.M. Aerts, J.J. Kastelein, M.M. Motazacker, others, Heterozygosity for a loss-of-function mutation in GALNT2 improves plasma triglyceride clearance in man, *Cell Metabolism*, 14 (2011) 811–818.
- [136] I.F. Tudorache, V.G. Trusca, A.V. Gafencu, Apolipoprotein E-A Multifunctional Protein with Implications in Various Pathologies as a Result of Its Structural Features, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 15 (2017) 359–365.
- [137] G. Utermann, Isolation and partial characterization of an arginine-rich apolipoprotein from human plasma very-low-density lipoproteins: apolipoprotein E, *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Für Physiologische Chemie*, 356 (1975) 1113–1122.
- [138] T. Gu, D.M. Gatti, A. Srivastava, E.M. Snyder, N. Raghupathy, P. Simecek, K.L. Svenson, I. Dotu, J.H. Chuang, M.P. Keller, others, Genetic architectures of quantitative variation in RNA editing pathways, *Genetics*, 202 (2016) 787–798.
- [139] C.-M. Lo, B.K. Nordskog, A.M. Nauli, S. Zheng, S.B. Vonlehmden, Q. Yang, D. Lee, L.L. Swift, N.O. Davidson, P. Tso, Why does the gut choose apolipoprotein B48 but not B100 for chylomicron formation?, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 294 (2008) 344–352.

- [140] J. Liang, H.N. Ginsberg, Microsomal triglyceride transfer protein binding and lipid transfer activities are independent of each other, but both are required for secretion of apolipoprotein B lipoproteins from liver cells, *Journal of Biological Chemistry*, 276 (2001) 28606–28612.
- [141] K. Williams, R.W. Brocia, E. Fisher, The unstirred water layer as a site of control of apolipoprotein B secretion, *Journal of Biological Chemistry*, 265 (1990) 16741–16744.
- [142] S. Ishibashi, M.S. Brown, J.L. Goldstein, R.D. Gerard, R.E. Hammer, J. Herz, Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery, *The Journal of Clinical Investigation*, 92 (1993) 883–893.
- [143] N.O. Davidson, G.S. Shelness, Apolipoprotein B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation, *Annual Review of Nutrition*, 20 (2000) 169–193.
- [144] C.M. Mansbach, F. Gorelick, Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption II Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 293 (2007) 645–650.
- [145] D.W. Russell, The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis, *Annual Review of Biochemistry*, 72 (2003) 137–174.
- [146] A. Dikkers, U.J. Tietge, Biliary cholesterol secretion: more than a simple ABC, *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 16 (2010) 5936.
- [147] N.B. Javitt, Biologic role (s) of the 25 (R), 26-hydroxycholesterol metabolic pathway, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1529 (2000) 136–141.
- [148] S. Abu-Hayyeh, G. Papacleovoulou, C. Williamson, Nuclear receptors, bile acids and cholesterol homeostasis series-Bile acids and pregnancy, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 368 (2013) 120–128.
- [149] S. Dzeletovic, O. Breuer, E. Lund, U. Diczfalusy, Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry, *Analytical Biochemistry*, 225 (1995) 73–80.
- [150] J. Li-Hawkins, E.G. Lund, S.D. Turley, D.W. Russell, Disruption of the oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene in mice, *Journal of Biological Chemistry*, 275 (2000) 16536–16542.
- [151] A.J. Brown, W. Jessup, Oxysterols: sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis, *Molecular Aspects of Medicine*, 30 (2009) 111–122.
- [152] J. Jurica, G. Dovrtelová, K. Noskova, O. Zendulka, Bile acids, nuclear receptors and cytochrome P450, *Physiological Research*, 65 (2016).
- [153] G.J. Schroeffer Jr, Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes, *Physiological Reviews*, 80 (2000) 361–554.
- [154] M. Trauner, J.L. Boyer, Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation, *Physiological Reviews*, 83 (2003) 633–671.
- [155] B. Stieger, Recent insights into the function and regulation of the bile salt export pump (ABCB11), *Current Opinion in Lipidology*, 20 (2009) 176–181.

- [156] R. Wang, H.-L. Chen, L. Liu, J.A. Sheps, M.J. Phillips, V. Ling, Compensatory role of P-glycoproteins in knockout mice lacking the bile salt export pump, *Hepatology*, 50 (2009) 948–956.
- [157] K. Jemnitz, K. Heredi-Szabo, J. Janossy, E. Ioja, L. Vereczkey, P. Krajcsi, ABCC2/Abcc2: a multispecific transporter with dominant excretory functions, *Drug Metabolism Reviews*, 42 (2010) 402–436.
- [158] J. Smit, A.H. Schinkel, R.O. Elferink, A. Groen, E. Wagenaar, L. Van Deemter, C. Mol, R. Ottenhoff, N. Van der Lugt, M. Van Roon, others, Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease, *Cell*, 75 (1993) 451–462.
- [159] R.O. Elferink, R. Ottenhoff, M. van Wijland, J. Smit, A.H. Schinkel, A.K. Groen, Regulation of biliary lipid secretion by *mdr2* P-glycoprotein in the mouse, *The Journal of Clinical Investigation*, 95 (1995) 31–38.
- [160] R. Elferink, A. Groen, Mechanisms of biliary lipid secretion and their role in lipid homeostasis, in: *Seminars in Liver Disease*, (2000) 293–306.
- [161] K.E. Berge, H. Tian, G.A. Graf, L. Yu, N.V. Grishin, J. Schultz, P. Kwiterovich, B. Shan, R. Barnes, H.H. Hobbs, Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters, *Science*, 290 (2000) 1771–1775.
- [162] G.A. Graf, W.-P. Li, R.D. Gerard, I. Gelissen, A. White, J.C. Cohen, H.H. Hobbs, Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface, *The Journal of Clinical Investigation*, 110 (2002) 659–669.
- [163] G.A. Graf, L. Yu, W.-P. Li, R. Gerard, P.L. Tuma, J.C. Cohen, H.H. Hobbs, ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion, *Journal of Biological Chemistry*, 278 (2003) 48275–48282.
- [164] L. Yu, J. Li-Hawkins, R.E. Hammer, K.E. Berge, J.D. Horton, J.C. Cohen, H.H. Hobbs, Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol, *The Journal of Clinical Investigation*, 110 (2002) 671–680.
- [165] L. Yu, R.E. Hammer, J. Li-Hawkins, K. Von Bergmann, D. Lutjohann, J.C. Cohen, H.H. Hobbs, Disruption of *Abcg5* and *Abcg8* in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (2002) 16237–16242.
- [166] J.L. Goldstein, M.S. Brown, Regulation of the mevalonate pathway, *Nature*, 343 (1990) 425.
- [167] L. Trapani, M. Segatto, V. Pallottini, Regulation and deregulation of cholesterol homeostasis: The liver as a metabolic “power station,” *World Journal of Hepatology*, 4 (2012) 184.
- [168] C. Yokoyama, X. Wang, M.R. Briggs, A. Admon, J. Wu, X. Hua, J.L. Goldstein, M.S. Brown, SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene, *Cell*, 75 (1993) 187–197.
- [169] X. Hua, C. Yokoyama, J. Wu, M.R. Briggs, M.S. Brown, J.L. Goldstein, X. Wang, SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90 (1993) 11603–11607.
- [170] M.S. Brown, J.L. Goldstein, The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor, *Cell*, 89 (1997) 331–340.

- [171] J.D. Horton, J.L. Goldstein, M.S. Brown, SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver, *The Journal of Clinical Investigation*, 109 (2002) 1125–1131.
- [172] A.C. Calkin, P. Tontonoz, Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13 (2012) 213.
- [173] M.I. Dawson, Z. Xia, The retinoid X receptors and their ligands, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1821 (2012) 21–56.
- [174] G.A. Preidis, K.H. Kim, D.D. Moore, Nutrient-sensing nuclear receptors PPARalpha and FXR control liver energy balance, *The Journal of Clinical Investigation*, 127 (2017) 1193–1201.
- [175] D. Bishop-Bailey, Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system, *British Journal of Pharmacology*, 129 (2000) 823–834.
- [176] C. Dreyer, G. Krey, H. Keller, F. Givel, G. Helftenbein, W. Wahli, Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors, *Cell*, 68 (1992) 879–887.
- [177] D.J. Mangelsdorf, R.M. Evans, The RXR heterodimers and orphan receptors, *Cell*, 83 (1995) 841–850.
- [178] I. Issemann, S. Green, Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators, *Nature*, 347 (1990) 645.
- [179] D.J. Parks, S.G. Blanchard, R.K. Bledsoe, G. Chandra, T.G. Consler, S.A. Kliewer, J.B. Stimmel, T.M. Willson, A.M. Zavacki, D.D. Moore, others, Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor, *Science*, 284 (1999) 1365–1368.
- [180] H. Wang, J. Chen, K. Hollister, L.C. Sowers, B.M. Forman, Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR, *Molecular Cell*, 3 (1999) 543–553.
- [181] N.Y. Kalaany, D.J. Mangelsdorf, LXRS and FXR: the yin and yang of cholesterol and fat metabolism, *Annu. Rev. Physiol.*, 68 (2006) 159–191.
- [182] S.M. Ulven, K.T. Dalen, J.-Å. Gustafsson, H.I. Nebb, LXR is crucial in lipid metabolism, Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 73 (2005) 59–63.
- [183] P.S. Pannu, S. Allahverdian, G.A. Francis, Oxysterol generation and liver X receptor-dependent reverse cholesterol transport: not all roads lead to Rome, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 368 (2013) 99–107.
- [184] G.A. Francis, The complexity of HDL, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801 (2010) 1286–1293.
- [185] P. Tontonoz, D.J. Mangelsdorf, Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease, *Molecular Endocrinology*, 17 (2003) 985–993.
- [186] Y. Zhang, J.J. Repa, K. Gauthier, D.J. Mangelsdorf, Regulation of lipoprotein lipase by the oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta, *Journal of Biological Chemistry*, 276 (2001) 43018–43024.
- [187] A.R. De Lera, W. Bourguet, L. Altucci, H. Gronemeyer, Design of selective nuclear receptor modulators: RAR and RXR as a case study, *Nature Reviews Drug Discovery*, 6 (2007) 811.
- [188] S. Maqdasy, M. Baptissart, A. Vega, S. Baron, J.-M.A. Lobaccaro, D.H. Volle, Cholesterol and male fertility: what about orphans and adopted?, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 368 (2013) 30–46.



- [189] K. Kurakula, A.A. Hamers, V. de Waard, C.J. de Vries, Nuclear Receptors in atherosclerosis: a superfamily with many "Goodfellas," *Molecular and Cellular Endocrinology*, 368 (2013) 71–84.
- [190] A. Dülsner, R. Hack, C. Krüger, M. Pils, D. Kira Scherer, B. Schmelting, M. Schmidt, H. Weinert, T.J. TVT, zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren, (n.d.).
- [191] K. Weingand, J. Bloom, M. Carakostas, R. Hall, M. Helfrich, K. Latimer, B. Levine, D. Neptun, A. Rebar, K. Stitzel, others, Clinical pathology testing recommendations for nonclinical toxicity and safety studies, *Toxicologic Pathology*, 20 (1992) 539–543.
- [192] A. Langsted, J.J. Freiberg, B.G. Nordestgaard, Fasting and nonfasting lipid levels: influence of normal food intake on lipids, lipoproteins, apolipoproteins, and cardiovascular risk prediction, *Circulation*, 118 (2008) 2047–2056.
- [193] P. Nigam, Serum lipid profile: fasting or non-fasting?, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 26 (2011) 96–97.
- [194] M. de Vries, B. Klop, M.C. Cabezas, The use of the non-fasting lipid profile for lipid-lowering therapy in clinical practice-Point of view, *Atherosclerosis*, 234 (2014) 473–475.
- [195] B.G. Nordestgaard, A. Langsted, S. Mora, G. Kolovou, H. Baum, E. Bruckert, G.F. Watts, G. Sypniewska, O. Wiklund, J. Borén, others, Fasting is not routinely required for determination of a lipid profile: clinical and laboratory implications including flagging at desirable concentration cut-points- a joint consensus statement from the European Atherosclerosis Society and European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, *European Heart Journal*, 37 (2016) 1944–1958.
- [196] U. Landmesser, H. Gohlke, R. Hambrecht, M. Kelm, U. Laufs, N. Marx, Kommentar zu den neuen Leitlinien (2016) der European Society of Cardiology und European Atherosclerosis Society zur Diagnostik und Therapie der DyslipidämienComments on the new guidelines (2016) of the European Society of Cardiology and the European Atherosclerosis Society on the diagnostics and treatment of dyslipidemias, *Der Kardiologe*, 11 (2017) 295–299.
- [197] Q. Li, Q. Jiang, J. LaRusso, J.F. Klement, A.C. Sartorelli, M.G. Belinsky, G.D. Kruh, J. Uitto, Targeted ablation of Abcc1 or Abcc3 in Abcc6<sup>-/-</sup> mice does not modify the ectopic mineralization process, *Experimental Dermatology*, 16 (2007) 853–859.
- [198] T.A. Miettinen, R.S. Tilvis, Y.A. Kesäniemi, Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population, *American Journal of Epidemiology*, 131 (1990) 20–31.
- [199] I. Björkhem, T. Miettinen, E. Reihner, S. Ewerth, B. Angelin, K. Einarsson, Correlation between serum levels of some cholesterol precursors and activity of HMG-CoA reductase in human liver, *Journal of Lipid Research*, 28 (1987) 1137–1143.
- [200] R.S. Tilvis, T.A. Miettinen, Serum plant sterols and their relation to cholesterol absorption, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 43 (1986) 92–97.
- [201] H. Gylling, T.A. Miettinen, Serum noncholesterol sterols related to cholesterol metabolism in familial hypercholesterolemia, *Clinica Chimica Acta*, 178 (1988) 41–49.
- [202] M. Vuoristo, R. Tilvis, T. Miettinen, Serum plant sterols and lathosterol related to cholesterol absorption in coeliac disease, *Clinica Chimica Acta*, 174 (1988) 213–224.
- [203] R.F. Chuaqui, R.F. Bonner, C.J. Best, J.W. Gillespie, M.J. Flaig, S.M. Hewitt, J.L. Phillips, D.B. Krizman, M.A. Tangrea, M. Ahram, others, Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments, *Nature Genetics*, 32 (2002) 509.

- [204] A. von Eckardstein, D. Kardassis, High density lipoproteins: from biological understanding to clinical exploitation, Springer, 2014.
- [205] Y. Sakakura, H. Shimano, H. Sone, A. Takahashi, K. Inoue, H. Toyoshima, S. Suzuki, N. Yamada, Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286 (2001) 176–183.
- [206] Z. Xiaoping, Y. Fajun, Regulation of SREBP-mediated gene expression, *Sheng Wu Wu Li Hsueh Bao*, 28 (2012) 287.
- [207] S. Kunnen, M. Van Eck, Lecithin: cholesterol acyltransferase: old friend or foe in atherosclerosis?, *Journal of Lipid Research*, 53 (2012) 1783–1799.
- [208] C. Semenkovich, S. Chen, M. Wims, C.-C. Luo, W. Li, L. Chan, Lipoprotein lipase and hepatic lipase mRNA tissue specific expression, developmental regulation, and evolution, *Journal of Lipid Research*, 30 (1989) 423–431.
- [209] H. Wang, R.H. Eckel, Lipoprotein lipase: from gene to obesity, *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 297 (2009) E271–E288.
- [210] T. Fu, Y. Guan, J. Xu, Y. Wang, APP, APLP2 and LRP1 interact with PCSK9 but are not required for PCSK9-mediated degradation of the LDLR in vivo, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862 (2017) 883–889.
- [211] K. Moitra, M. Dean, Evolution of ABC transporters by gene duplication and their role in human disease, *Biological Chemistry*, 392 (2011) 29–37.
- [212] M. Kuroda, Y. Kobayashi, Y. Tanaka, T. Itani, R. Mifuji, J. Araki, M. Kaito, Y. Adachi, Increased hepatic and renal expressions of multidrug resistance-associated protein 3 in Eisai hyperbilirubinuria rats, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 19 (2004) 146–153.
- [213] A. Pujol, I. Ferrer, C. Camps, E. Metzger, C. Hindelang, N. Callizot, M. Ruiz, T. Pàmols, M. Giròs, J.L. Mandel, Functional overlap between ABCD1 (ALD) and ABCD2 (ALDR) transporters: a therapeutic target for X-adrenoleukodystrophy, *Human Molecular Genetics*, 13 (2004) 2997–3006.
- [214] Q. Jiang, M. Endo, F. Dibra, K. Wang, J. Uitto, Pseudoxanthoma elasticum is a metabolic disease, *J. Invest. Dermatol.*, 129 (2009) 348–54.
- [215] G. Köblös, H. Andrikovics, Z. Prohászka, A. Tordai, A. Váradi, T. Arányi, The R1141X loss-of-function mutation of the ABCC6 gene is a strong genetic risk factor for coronary artery disease, *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 14 (2010) 75–78.
- [216] Q. Jiang, Q. Li, J. Uitto, Aberrant mineralization of connective tissues in a mouse model of pseudoxanthoma elasticum: systemic and local regulatory factors, *Journal of Investigative Dermatology*, 127 (2007) 1392–1402.
- [217] M.R. Rasmussen, K.L. Nielsen, M.R. Laursen, C.B. Nielsen, P. Svendsen, H. Dimke, E.I. Christensen, M. Johannsen, S.K. Moestrup, Untargeted metabolomics analysis of ABCC6-deficient mice discloses an altered metabolic liver profile, *Journal of Proteome Research*, 15 (2016) 4591–4600.
- [218] L. Pisciotta, P. Tarugi, C. Borrini, A. Bellocchio, R. Fresa, D. Guerra, D. Quaglino, I. Ronchetti, S. Calandra, S. Bertolini, Pseudoxanthoma elasticum and familial hypercholesterolemia: A deleterious combination of cardiovascular risk factors, *Atherosclerosis*, 210 (2010) 173–176.

- [219] T. Vanmierlo, O. Weingärtner, S. van der Pol, C. Husche, A. Kerksiek, S. Friedrichs, E. Sijbrands, H. Steinbusch, M. Grimm, T. Hartmann, others, Dietary intake of plant sterols stably increases plant sterol levels in the murine brain, *Journal of Lipid Research*, 53 (2012) 726–735.
- [220] N.R. Matthan, M. Raeini-Sarjaz, A.H. Lichtenstein, L.M. Ausman, P.J. Jones, Deuterium uptake and plasma cholesterol precursor levels correspond as methods for measurement of endogenous cholesterol synthesis in hypercholesterolemic women, *Lipids*, 35 (2000) 1037–1044.
- [221] T. Heinemann, G. Axtmann, K. von Bergmann, Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man, *European Journal of Clinical Investigation*, 23 (1993) 827–831.
- [222] R.E. Ostlund Jr, J.B. McGill, C.-M. Zeng, D.F. Covey, J. Stearns, W.F. Stenson, C.A. Spilburg, Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy Delta5-phytosterols and phytosterols in humans, *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 282 (2002) E911–E916.
- [223] E.D. Jesch, T.P. Carr, Food Ingredients That Inhibit Cholesterol Absorption, *Preventive Nutrition and Food Science*, 22 (2017) 67.
- [224] N.R. Matthan, A.H. Lichtenstein, Approaches to measuring cholesterol absorption in humans, *Atherosclerosis*, 174 (2004) 197–205.
- [225] M.-H. Lee, K. Lu, S. Hazard, H. Yu, S. Shulenin, H. Hidaka, H. Kojima, R. Allikmets, N. Sakuma, R. Pegoraro, others, Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption, *Nature Genetics*, 27 (2001) 79.
- [226] A.K. Bhattacharyya, W.E. Connor, beta-Sitosterolemia and xanthomatosis: a newly described lipid storage disease in two sisters, *The Journal of Clinical Investigation*, 53 (1974) 1033–1043.
- [227] R. Gregg, W. Connor, D. Lin, H. Brewer, Abnormal metabolism of shellfish sterols in a patient with sitosterolemia and xanthomatosis, *The Journal of Clinical Investigation*, 77 (1986) 1864–1872.
- [228] Y. Xie, V. Blanc, T.A. Kerr, S. Kennedy, J. Luo, E.P. Newberry, N.O. Davidson, Decreased expression of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase and altered bile acid metabolism in apobec-1-/- mice lead to increased gallstone susceptibility, *Journal of Biological Chemistry*, 284 (2009) 16860–16871.
- [229] Y. Xie, H.Y.J. Fung, E.P. Newberry, S. Kennedy, J. Luo, R.M. Crooke, M.J. Graham, N.O. Davidson, Hepatic Mttp deletion reverses gallstone susceptibility in L-Fabp knockout mice, *Journal of Lipid Research*, 55 (2014) 540–548.
- [230] J.E. Wu, F. Basso, R.D. Shamburek, M.J. Amar, B. Vaisman, G. Szakacs, C. Joyce, T. Tansey, L. Freeman, B.J. Paigen, others, Hepatic ABCG5 and ABCG8 overexpression increases hepatobiliary sterol transport but does not alter aortic atherosclerosis in transgenic mice, *Journal of Biological Chemistry*, 279 (2004) 22913–22925.
- [231] K. Beck, K. Hayashi, B. Nishiguchi, O.L. Saux, M. Hayashi, C.D. Boyd, The distribution of Abcc6 in normal mouse tissues suggests multiple functions for this ABC transporter, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 51 (2003) 887–902.
- [232] J. Taipalensuu, H. Törnblom, G. Lindberg, C. Einarsson, F. Sjöqvist, H. Melhus, P. Garberg, B. Sjöström, B. Lundgren, P. Artursson, Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 299 (2001) 164–170.

- [233] K. Beck, K. Hayashi, K. Dang, M. Hayashi, C.D. Boyd, Analysis of ABCC6 (MRP6) in normal human tissues, *Histochem. Cell Biol.*, 123 (2005) 517–28.
- [234] D.M. Mutch, P. Anderle, M. Fiaux, R. Mansourian, K. Vidal, W. Wahli, G. Williamson, M.-A. Roberts, Regional variations in ABC transporter expression along the mouse intestinal tract, *Physiological Genomics*, 17 (2004) 11–20.
- [235] Y. Matsuzaki, A. Nakano, Q.J. Jiang, L. Pulkkinen, J. Uitto, Tissue-specific expression of the ABCC6 gene, *Journal of Investigative Dermatology*, 125 (2005) 900–905.
- [236] I. Ikeda, M. Sugano, Some aspects of mechanism of inhibition of cholesterol absorption by beta-sitosterol, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 732 (1983) 651–658.
- [237] F.J. Field, S.N. Mathur, beta-sitosterol: esterification by intestinal acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) and its effect on cholesterol esterification, *Journal of Lipid Research*, 24 (1983) 409–417.
- [238] Y. Hamamoto, K. Nagai, H. Yasui, M. Muto, Hyperreactivity of pseudoxanthoma elasticum-affected dermis to vitamin D3, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 42 (2000) 685–687.
- [239] M. Tibuakuu, D. Zhao, I.H. de Boer, E. Guallar, A.E. Bortnick, P.L. Lutsey, M.J. Budoff, J.R. Kizer, B.R. Kestenbaum, E.D. Michos, Relation of serum vitamin D to risk of mitral annular and aortic valve calcium (from the multi-ethnic study of atherosclerosis), *American Journal of Cardiology*, 120 (2017) 473–478.
- [240] T. Ellam, A. Hameed, R. ul Haque, M. Muthana, M. Wilkie, S.E. Francis, T.J. Chico, Vitamin D deficiency and exogenous vitamin D excess similarly increase diffuse atherosclerotic calcification in apolipoprotein E knockout mice, *PLoS One*, 9 (2014) e88767.
- [241] I.K. Murni, D.C. Sulistyoningrum, V. Oktaria, Association of vitamin D deficiency with cardiovascular disease risk in children: implications for the Asia Pacific Region, *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 25 (2016) 8–19.
- [242] J. Reichrath, Unravelling of hidden secrets: The role of vitamin D in skin aging, *Dermato-Endocrinology*, 4 (2012) 241–244.
- [243] S. Pacini, G. Morucci, J.J. Branca, S. Aterini, M. Amato, M. Gulisano, M. Ruggiero, Effects of vitamin D3 and paricalcitol on immature cardiomyocytes: a novel role for vitamin D analogs in the prevention of cardiovascular diseases, *Nutrients*, 5 (2013) 2076–2092.
- [244] H. Meng, I. Vera, N. Che, X. Wang, S.S. Wang, L. Ingram-Drake, E.E. Schadt, T.A. Drake, A.J. Lusis, Identification of *Abcc6* as the major causal gene for dystrophic cardiac calcification in mice through integrative genomics, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (2007) 4530–4535.
- [245] Z. Aherrahrou, L.C. Doeiring, E.-M. Ehlers, H. Liptau, R. Depping, P. Linsel-Nitschke, P.M. Kaczmarek, J. Erdmann, H. Schunkert, An alternative splice variant in *Abcc6*, the gene causing dystrophic calcification, leads to protein deficiency in C3H/He mice, *Journal of Biological Chemistry*, 283 (2008) 7608–7615.
- [246] A.-K. Sowa, F.J. Kaiser, J. Eckhold, T. Kessler, R. Aherrahrou, S. Wrobel, P.M. Kaczmarek, L. Doeiring, H. Schunkert, J. Erdmann, others, Functional interaction of osteogenic transcription factors Runx2 and Vdr in transcriptional regulation of *Opn* during soft tissue calcification, *The American Journal of Pathology*, 183 (2013) 60–68.
- [247] K.L. Berkner, Vitamin K-dependent carboxylation, *Vitamins & Hormones*, 78 (2008) 131–156.

- [248] P. Borst, K. van de Wetering, R. Schlingemann, Does the absence of ABCC6 (multidrug resistance protein 6) in patients with Pseudoxanthoma elasticum prevent the liver from providing sufficient vitamin K to the periphery?, *Cell Cycle*, 7 (2008) 1575–1579.
- [249] O.M. Vanakker, L. Martin, L.J. Schurgers, D. Quaglino, L. Costrop, C. Vermeer, I. Pasquali-Ronchetti, P.J. Coucke, A. De Paepe, Low serum vitamin K in PXE results in defective carboxylation of mineralization inhibitors similar to the GGCX mutations in the PXE-like syndrome, *Laboratory Investigation*, 90 (2010) 895.
- [250] C. Brampton, Y. Yamaguchi, O. Vanakker, L. Van Laer, L.-H. Chen, M. Thakore, A. De Paepe, V. Pomozi, P.T. Szabó, L. Martin, others, Vitamin K does not prevent soft tissue mineralization in a mouse model of pseudoxanthoma elasticum, *Cell Cycle*, 10 (2011) 1810–1820.
- [251] T.G. Gorgels, J.H. Waarsing, M. Herfs, D. Versteeg, F. Schoensiegel, T. Sato, R.O. Schlingemann, B. Ivandic, C. Vermeer, L.J. Schurgers, others, Vitamin K supplementation increases vitamin K tissue levels but fails to counteract ectopic calcification in a mouse model for pseudoxanthoma elasticum, *Journal of Molecular Medicine*, 89 (2011) 1125.
- [252] Q. Jiang, Q. Li, A.E. Grand-Pierre, L.J. Schurgers, J. Uitto, Administration of vitamin K does not counteract the ectopic mineralization of connective tissues in *Abcc6*<sup>-/-</sup> mice, a model for pseudoxanthoma elasticum, *Cell Cycle*, 10 (2011) 701–707.
- [253] L.P. van der Zwan, T. Teerlink, J.M. Dekker, R.M. Henry, C.D. Stehouwer, C. Jakobs, R.J. Heine, P.G. Scheffer, Circulating oxidized LDL: determinants and association with brachial flow-mediated dilation, *Journal of Lipid Research*, 50 (2009) 342–349.
- [254] M.J. Järvisalo, T. Lehtimäki, O.T. Raitakari, Determinants of arterial nitrate-mediated dilatation in children: role of oxidized low-density lipoprotein, endothelial function, and carotid intima-media thickness, *Circulation*, 109 (2004) 2885–2889.
- [255] H. Matsuoka, Endothelial dysfunction associated with oxidative stress in human, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 54 (2001) 65–72.
- [256] I. Pasquali-Ronchetti, M.I. Garcia-Fernandez, F. Boraldi, D. Quaglino, D. Gheduzzi, C. De Vincenzi Paolinelli, R. Tiozzo, S. Bergamini, D. Ceccarelli, U. Muscatello, Oxidative stress in fibroblasts from patients with pseudoxanthoma elasticum: possible role in the pathogenesis of clinical manifestations, *The Journal of Pathology*, 208 (2006) 54–61.
- [257] M.I. Garcia-Fernandez, D. Gheduzzi, F. Boraldi, C.D. Paolinelli, P. Valdivielso, M.J. Morilla, D. Quaglino, D. Guerra, S. Casolari, L. Bercovitch, others, Parameters of oxidative stress are present in the circulation of PXE patients, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1782 (2008) 474–481.
- [258] Q. Li, Q. Jiang, J. Uitto, Pseudoxanthoma elasticum: oxidative stress and antioxidant diet in a mouse model (*Abcc6*<sup>-/-</sup>), *Journal of Investigative Dermatology*, 128 (2008) 1160–1164.
- [259] F. Boraldi, G. Annovi, D. Guerra, C. Paolinelli DeVincenzi, M.I. Garcia-Fernandez, F. Panico, G. De Santis, R. Tiozzo, I. Ronchetti, D. Quaglino, Fibroblast protein profile analysis highlights the role of oxidative stress and vitamin K recycling in the pathogenesis of pseudoxanthoma elasticum, *Proteomics-Clinical Applications*, 3 (2009) 1084–1098.
- [260] L. Van Tits, T. Van Himbergen, H. Lemmers, J. De Graaf, A. Stalenhoef, Proportion of oxidized LDL relative to plasma apolipoprotein B does not change during statin therapy in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia, *Atherosclerosis*, 185 (2006) 307–312.
- [261] C. Meisinger, J. Baumert, N. Khuseynova, H. Loewel, W. Koenig, Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population, *Circulation*, 112 (2005) 651–657.

- [262] S. Tsimikas, P. Willeit, J. Willeit, P. Santer, M. Mayr, Q. Xu, A. Mayr, J.L. Witztum, S. Kiechl, Oxidation-specific biomarkers, prospective 15-year cardiovascular and stroke outcomes, and net reclassification of cardiovascular events, *Journal of the American College of Cardiology*, 60 (2012) 2218–2229.
- [263] C. Xie, S.D. Turley, J.M. Dietschy, Cholesterol accumulation in tissues of the Niemann-Pick type C mouse is determined by the rate of lipoprotein-cholesterol uptake through the coated-pit pathway in each organ, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 (1999) 11992–11997.
- [264] M.Y. van der Wulp, H.J. Verkade, A.K. Groen, Regulation of cholesterol homeostasis, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 368 (2013) 1–16.
- [265] A.S. Plump, J.D. Smith, T. Hayek, K. Aalto-Setälä, A. Walsh, J.G. Verstuyft, E.M. Rubin, J.L. Breslow, Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells, *Cell*, 71 (1992) 343–353.
- [266] D. Gradinaru, C. Borsa, C. Ionescu, G.I. Prada, Oxidized LDL and NO synthesis-biomarkers of endothelial dysfunction and ageing, *Mechanisms of Ageing and Development*, 151 (2015) 101–113.
- [267] G. Zuliani, M.L. Morieri, S. Volpato, G.B. Vigna, C.B. Tch, M. Maggio, A. Cherubini, S. Bandinelli, J.M. Guralnik, L. Ferrucci, Determinants and clinical significance of plasma oxidized LDLs in older individuals A 9 years follow-up study, *Atherosclerosis*, 226 (2013) 201–207.
- [268] J.M. Dietschy, S.D. Turley, Control of cholesterol turnover in the mouse, *Journal of Biological Chemistry*, 277 (2002) 3801–3804.
- [269] M.S. Brown, J.L. Goldstein, Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth, *Journal of Lipid Research*, 21 (1980) 505–517.
- [270] B.R. Krause, A.D. Hartman, Adipose tissue and cholesterol metabolism, *Journal of Lipid Research*, 25 (1984) 97–110.
- [271] E.E. Kershaw, J.S. Flier, Adipose tissue as an endocrine organ, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89 (2004) 2548–2556.
- [272] C. Yang, C. Wang, M. Ye, C. Jin, W. He, F. Wang, W.L. McKeehan, Y. Luo, Control of lipid metabolism by adipocyte FGFR1-mediated adipohepatic communication during hepatic stress, *Nutrition & Metabolism*, 9 (2012) 94.
- [273] N. Itoh, Y. Nakayama, M. Konishi, Roles of FGFs as paracrine or endocrine signals in liver development, health, and disease, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4 (2016) 30.
- [274] P. Kuzaj, J. Kuhn, M. Dabisch-Ruthe, I. Faust, C. Götting, C. Knabbe, D. Hendig, ABCC6-a new player in cellular cholesterol and lipoprotein metabolism?, *Lipids in Health and Disease*, 13 (2014) 118.
- [275] K. Neldner, *Clinics in Dermatology Pseudoxanthoma Elasticum Vol 6 (1)*, (1988).
- [276] Q. Li, J. Kingman, K. van de Wetering, S. Tannouri, J.P. Sundberg, J. Uitto, Abcc6 Knockout Rat Model Highlights the Role of Liver in PPI Homeostasis in Pseudoxanthoma Elasticum, *Journal of Investigative Dermatology*, 137 (2017) 1025–1032.
- [277] N. Horiuchi, T. Maeda, Statins and bone metabolism, *Oral Diseases*, 12 (2006) 85–101.

- [278] M.J. Hosen, P.J. Coucke, O. Le Saux, A. De Paepe, O.M. Vanakker, Perturbation of specific pro-mineralizing signalling pathways in human and murine pseudoxanthoma elasticum, *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 9 (2014) 66.
- [279] F. Verrecchia, A. Mauviel, Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation, *Journal of Investigative Dermatology*, 118 (2002) 211–215.
- [280] A. Roberts, U. Heine, K. Flanders, M. Sporn, TGF-beta: Major role in regulation of extracellular matrix, *Ann NY Acad Sci*, 580 (1990) 225–232.
- [281] U. Kucich, J.C. Rosenbloom, G. Shen, W.R. Abrams, M.A. Blaskovich, A.D. Hamilton, J. Ohkanda, S.M. Sebt, J. Rosenbloom, Requirement for geranylgeranyl transferase I and acyl transferase in the TGF-beta stimulated pathway leading to elastin mRNA stabilization, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 252 (1998) 111–116.
- [282] T.F. McGuire, Y. Qian, A. Vogt, A.D. Hamilton, S.M. Sebt, Platelet-derived growth factor receptor tyrosine phosphorylation requires protein geranylgeranylation but not farnesylation, *Journal of Biological Chemistry*, 271 (1996) 27402–27407.
- [283] A. Vogt, Y. Qian, T.F. McGuire, A.D. Hamilton, S.M. Sebt, Protein geranylgeranylation, not farnesylation, is required for the G1 to S phase transition in mouse fibroblasts, *Oncogene*, 13 (1996) 1991–1999.
- [284] M. Morgan, A. Ganser, C. M Reuter, Targeting the RAS signaling pathway in malignant hematologic diseases, *Current Drug Targets*, 8 (2007) 217–235.
- [285] Q. Li, J.P. Sundberg, M.A. Levine, S.F. Terry, J. Uitto, The effects of bisphosphonates on ectopic soft tissue mineralization caused by mutations in the ABCC6 gene, *Cell Cycle*, 14 (2015) 1082–1089.
- [286] S.N. Moore, S.B. Tanner, J.G. Schoenecker, Bisphosphonates: from softening water to treating PXE, *Cell Cycle*, 14 (2015) 1354.
- [287] Q. Li, J. Kingman, J.P. Sundberg, M.A. Levine, J. Uitto, Dual effects of bisphosphonates on ectopic skin and vascular soft tissue mineralization versus bone microarchitecture in a mouse model of generalized arterial calcification of infancy, *Journal of Investigative Dermatology*, 136 (2016) 275–283.
- [288] A.M. Blazquez-Medela, P.J. Guihard, J. Yao, M. Jumabay, A.J. Lusis, K.I. Boström, Y. Yao, ABCC6 deficiency is associated with activation of BMP signaling in liver and kidney, *FEBS Open Bio*, 5 (2015) 257–263.
- [289] S. Lin, K. Mequanint, The role of Ras-ERK-IL-1beta signaling pathway in upregulation of elastin expression by human coronary artery smooth muscle cells cultured in 3D scaffolds, *Biomaterials*, 33 (2012) 7047–7056.
- [290] P.M. Royce, B. Steinmann, *Connective tissue and its heritable disorders: molecular, genetic, and medical aspects*, John Wiley & Sons, 2003.
- [291] A.D. Nguyen, J.G. McDonald, R.K. Bruick, R.A. DeBose-Boyd, Hypoxia stimulates degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase through accumulation of lanosterol and hypoxia-inducible factor-mediated induction of insigs, *Journal of Biological Chemistry*, 282 (2007) 27436–27446.
- [292] R.A. DeBose-Boyd, Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase, *Cell Research*, 18 (2008) 609.

- [293] T.M. van Himbergen, S. Otokozaawa, N.R. Matthan, E.J. Schaefer, A. Buchsbaum, M. Ai, L.J. van Tits, J. De Graaf, A.F. Stalenhoef, Familial combined hyperlipidemia is associated with alterations in the cholesterol synthesis pathway, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30 (2010) 113–120.
- [294] C. Gälman, B. Angelin, M. Rudling, Pronounced variation in bile acid synthesis in humans is related to gender, hypertriglyceridaemia and circulating levels of fibroblast growth factor 19, *Journal of Internal Medicine*, 270 (2011) 580–588.
- [295] S. Wang, J.D. Smith, ABCA1 and nascent HDL biogenesis, *Biofactors*, 40 (2014) 547–554.
- [296] P.W. Wilson, High-density lipoprotein, low-density lipoprotein and coronary artery disease, *The American Journal of Cardiology*, 66 (1990) A7–A10.
- [297] A. Otocka-Kmiecik, D.P. Mikhailidis, S.J. Nicholls, M. Davidson, J. Rysz, M. Banach, Dysfunctional HDL: a novel important diagnostic and therapeutic target in cardiovascular disease?, *Progress in Lipid Research*, 51 (2012) 314–324.
- [298] K.E. Stremier, D.M. Stafforini, S.M. Prescott, T.M. McIntyre, Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase Oxidatively fragmented phospholipids as substrates, *Journal of Biological Chemistry*, 266 (1991) 11095–11103.
- [299] N.S. Shachter, T. Ebara, R. Ramakrishnan, G. Steiner, J.L. Breslow, H.N. Ginsberg, J.D. Smith, Combined hyperlipidemia in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein C1, *The Journal of Clinical Investigation*, 98 (1996) 846–855.
- [300] J. Van Ree, M. Hofker, W. Van den Broek, J. Van Deursen, H. Van der Boom, R. Frants, B. Wieringa, L. Havekes, Increased response to cholesterol feeding in apolipoprotein C1-deficient mice, *Biochemical Journal*, 305 (1995) 905.
- [301] P.M. Bale, P. Clifton-Bligh, B. Benjamin, H. Whyte, Pathology of Tangier disease, *Journal of Clinical Pathology*, 24 (1971) 609–616.
- [302] S. Lorkowski, M. Kratz, C. Wenner, R. Schmidt, B. Weitkamp, M. Fobker, J. Reinhardt, J. Rauterberg, E.A. Galinski, P. Cullen, Expression of the ATP-binding cassette transporter gene ABCG1 (ABC8) in Tangier disease, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 283 (2001) 821–830.
- [303] J. Kuivenhoven, H. Pritchard, J. Hill, J. Frohlich, G. Assmann, J. Kastelein, The molecular pathology of lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes, *Journal of Lipid Research*, 38 (1997) 191–205.
- [304] D.S. Ng, Insight into the role of LCAT from mouse models, *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 5 (2004) 311–318.
- [305] R. Guerra, J. Wang, S.M. Grundy, J.C. Cohen, A hepatic lipase (LIPC) allele associated with high plasma concentrations of high density lipoprotein cholesterol, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94 (1997) 4532–4537.
- [306] P. Kee, K.-A. Rye, J.L. Taylor, P.H.R. Barrett, P.J. Barter, Metabolism of apoA-I as lipid-free protein or as component of discoidal and spherical reconstituted HDLs: studies in wild-type and hepatic lipase transgenic rabbits, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22 (2002) 1912–1917.
- [307] W. Weng, N.A. Brandenburg, S. Zhong, J. Halkias, L. Wu, X. Jiang, A. Tall, J.L. Breslow, ApoA-II maintains HDL levels in part by inhibition of hepatic lipase: studies in apoA-II and hepatic lipase double knockout mice, *Journal of Lipid Research*, 40 (1999) 1064–1070.



- [308] M. Bamji-Mirza, W. Zhang, Z. Yao, Expression of human hepatic lipase negatively impacts apolipoprotein AI production in primary hepatocytes from Lipc-null mice, *Journal of Biomedical Research*, 28 (2014) 201.
- [309] M. Abifadel, M. Varret, J.-P. Rabès, D. Allard, K. Ouguerram, M. Devillers, C. Cruaud, S. Benjannet, L. Wickham, D. Erlich, others, Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia, *Nature Genetics*, 34 (2003) 154.
- [310] T.L. Innerarity, R.W. Mahley, K.H. Weisgraber, T.P. Bersot, R. Krauss, G. Vega, S. Grundy, W. Friedl, J. Davignon, B. McCarthy, Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia, *Journal of Lipid Research*, 31 (1990) 1337–1349.
- [311] D.A. Blasiolo, R.A. Davis, A.D. Attie, The physiological and molecular regulation of lipoprotein assembly and secretion, *Molecular Biosystems*, 3 (2007) 608–619.
- [312] K. Schoonjans, J. Peinado-Onsurbe, A.-M. Lefebvre, R.A. Heyman, M. Briggs, S. Deeb, B. Staels, J. Auwerx, PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene, *The EMBO Journal*, 15 (1996) 5336–5348.
- [313] J.K. Kim, J.J. Fillmore, Y. Chen, C. Yu, I.K. Moore, M. Pypaert, E.P. Lutz, Y. Kako, W. Velez-Carrasco, I.J. Goldberg, others, Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (2001) 7522–7527.
- [314] T. Hirano, F. Nishioka, T. Murakami, Measurement of the serum lipoprotein lipase concentration is useful for studying triglyceride metabolism: Comparison with postheparin plasma, *Metabolism-Clinical and Experimental*, 53 (2004) 526–531.
- [315] J. Kobayashi, A. Nohara, M. Kawashiri, A. Inazu, J. Koizumi, K. Nakajima, H. Mabuchi, Serum lipoprotein lipase mass: clinical significance of its measurement, *Clinica Chimica Acta*, 378 (2007) 7–12.
- [316] A. Grefhorst, M.C. McNutt, T.A. Lagace, J.D. Horton, Plasma PCSK9 preferentially reduces liver LDL receptors in mice, *Journal of Lipid Research*, 49 (2008) 1303–1311.
- [317] S.W. Park, Y.-A. Moon, J.D. Horton, Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver, *Journal of Biological Chemistry*, 279 (2004) 50630–50638.
- [318] S. Rashid, D.E. Curtis, R. Garuti, N.N. Anderson, Y. Bashmakov, Y. Ho, R.E. Hammer, Y.-A. Moon, J.D. Horton, Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (2005) 5374–5379.
- [319] D.C. Chan, G. Lambert, P.H.R. Barrett, K.-A. Rye, E.M. Ooi, G.F. Watts, Plasma proprotein convertase subtilisin/kexin type 9: a marker of LDL apolipoprotein B-100 catabolism?, *Clinical Chemistry*, 55 (2009) 2049–2052.
- [320] M. Liu, W. Zhang, X. Li, J. Han, Y. Chen, Y. Duan, Impact of age and sex on the development of atherosclerosis and expression of the related genes in apoE deficient mice, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 469 (2016) 456–462.
- [321] C. Galman, M. Matasconi, L. Persson, P. Parini, B. Angelin, M. Rudling, Age-induced hypercholesterolemia in the rat relates to reduced elimination but not increased intestinal absorption of cholesterol, *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 293 (2007) 737–742.

- [322] W. Guo, J. Fu, X. Chen, B. Gao, Z. Fu, H. Fan, Q. Cui, X. Zhu, Y. Zhao, T. Yang, others, The effects of estrogen on serum level and hepatocyte expression of PCSK9, *Metabolism-Clinical and Experimental*, 64 (2015) 554–560.
- [323] M. Ruscica, N. Ferri, F. Fogacci, M. Rosticci, M. Botta, S. Marchiano, P. Magni, S. D'Addato, M. Giovannini, C. Borghi, others, Circulating levels of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 and arterial stiffness in a large population sample: Data from the brisighella heart study, *Journal of the American Heart Association*, 6 (2017) e005764.
- [324] J.D. Horton, N.A. Shah, J.A. Warrington, N.N. Anderson, S.W. Park, M.S. Brown, J.L. Goldstein, Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (2003) 12027–12032.
- [325] J. Luo, D.J. Duggan, Y. Chen, J. Sauvageot, C.M. Ewing, M.L. Bittner, J.M. Trent, W.B. Isaacs, Human prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: molecular dissection by gene expression profiling, *Cancer Research*, 61 (2001) 4683–4688.
- [326] A.-E. Al Moustafa, M.A. Alaoui-Jamali, G. Batist, M. Hernandez-Perez, C. Serruya, L. Alpert, M.J. Black, R. Sladek, W.D. Foulkes, Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells, *Oncogene*, 21 (2002) 2634.
- [327] K. Rader, R.A. Orlando, X. Lou, M.G. Farquhar, Characterization of ANKRA, a novel ankyrin repeat protein that interacts with the cytoplasmic domain of megalin, *Journal of the American Society of Nephrology*, 11 (2000) 2167–2178.
- [328] H.-H. Lim, C.-S. Park, Identification and functional characterization of ankyrin-repeat family protein ANKRA as a protein interacting with BKCa channel, *Molecular Biology of the Cell*, 16 (2005) 1013–1025.
- [329] A.H. Wang, S. Grégoire, E. Zika, L. Xiao, C.S. Li, H. Li, K.L. Wright, J.P. Ting, X.-J. Yang, Identification of the ankyrin repeat proteins ANKRA and RFXANK as novel partners of class IIa histone deacetylases, *Journal of Biological Chemistry*, 280 (2005) 29117–29127.
- [330] T.A. McKinsey, K. Kuwahara, S. Bezprozvannaya, E.N. Olson, Class II histone deacetylases confer signal responsiveness to the ankyrin-repeat proteins ANKRA2 and RFXANK, *Molecular Biology of the Cell*, 17 (2006) 438–447.
- [331] T. Langmann, R. Mauerer, A. Zahn, C. Moehle, M. Probst, W. Stremmel, G. Schmitz, Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues, *Clinical Chemistry*, 49 (2003) 230–238.
- [332] Q. Li, J. Uitto, Expression of the Abca-subfamily of genes in Abcc6<sup>-/-</sup> mice-upregulation of Abca4, *Experimental Dermatology*, 20 (2011) 452–454.
- [333] M.F. Beers, S. Mulugeta, The biology of the ABCA3 lipid transporter in lung health and disease, *Cell and Tissue Research*, 367 (2017) 481–493.
- [334] S. Mulugeta, J.M. Gray, K.L. Notarfrancesco, L.W. Gonzales, M. Koval, S.I. Feinstein, P.L. Ballard, A.B. Fisher, H. Shuman, Identification of LBM180, a lamellar body limiting membrane protein of alveolar type II cells, as the ABC transporter protein ABCA3, *Journal of Biological Chemistry*, 277 (2002) 22147–22155.
- [335] M. Huls, J.J. van den Heuvel, H.B. Dijkman, F.G. Russel, R. Masereeuw, ABC transporter expression profiling after ischemic reperfusion injury in mouse kidney, *Kidney International*, 69 (2006) 2186–2193.

- [336] A. Piehler, W.E. Kaminski, J.J. Wenzel, T. Langmann, G. Schmitz, Molecular structure of a novel cholesterol-responsive A subclass ABC transporter, ABCA9, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295 (2002) 408–416.
- [337] J.J. Wenzel, A. Piehler, W.E. Kaminski, ABC A-subclass proteins: gatekeepers of cellular phospho- and sphingolipid transport, *Front Biosci*, 12 (2007) 3177–3193.
- [338] L. Trigueros-Motos, J.C. van Capelleveen, F. Torta, D. Castaño, L.-H. Zhang, E.C. Chai, M. Kang, L.G. Dimova, A.W. Schimmel, I. Tietjen, others, ABCA8 Regulates Cholesterol Efflux and High-Density Lipoprotein Cholesterol Levels, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37 (2017) 2147–2155.
- [339] I. Weinhofer, S. Forss-Petter, M. Zigman, J. Berger, Cholesterol regulates ABCD2 expression: implications for the therapy of X-linked adrenoleukodystrophy, *Human Molecular Genetics*, 11 (2002) 2701–2708.
- [340] N. Linka, F.L. Theodoulou, Metabolite transporters of the plant peroxisomal membrane: known and unknown, in: *Peroxisomes and Their Key Role in Cellular Signaling and Metabolism*, Springer, (2013) 169–194.
- [341] S.J. Mihalik, S.J. Steinberg, Z. Pei, J. Park, D.G. Kim, A.K. Heinzer, G. Dacremont, R.J. Wanders, D.A. Cuebas, K.D. Smith, others, Participation of two members of the very long-chain acyl-CoA synthetase family in bile acid synthesis and recycling, *Journal of Biological Chemistry*, 277 (2002) 24771–24779.
- [342] D. Kobayashi, M. Kusama, M. Onda, N. Nakahata, The effect of pantothenic acid deficiency on keratinocyte proliferation and the synthesis of keratinocyte growth factor and collagen in fibroblasts, *Journal of Pharmacological Sciences*, 115 (2011) 230–234.
- [343] A. Alfonso-Pecchio, M. Garcia, R. Leonardi, S. Jackowski, Compartmentalization of mammalian pantothenate kinases, *PloS One*, 7 (2012) e49509.
- [344] S. Langheim, L. Yu, K. von Bergmann, D. Lütjohann, F. Xu, H.H. Hobbs, J.C. Cohen, ABCG5 and ABCG8 require MDR2 for secretion of cholesterol into bile, *Journal of Lipid Research*, 46 (2005) 1732–1738.
- [345] T. Ito, Physiological function of ABCG1, *Drug News Perspect*, 16 (2003) 490–492.
- [346] M. Fuchs, B. Ivandic, O. Müller, C. Schalla, J. Scheibner, P. Bartsch, E.F. Stange, Biliary cholesterol hypersecretion in gallstone-susceptible mice is associated with hepatic up-regulation of the high-density lipoprotein receptor SRBI, *Hepatology*, 33 (2001) 1451–1459.
- [347] H. Uppal, Y. Zhai, A. Gangopadhyay, S. Khadem, S. Ren, J.A. Moser, W. Xie, Activation of liver X receptor sensitizes mice to gallbladder cholesterol crystallization, *Hepatology*, 47 (2008) 1331–1342.
- [348] D.F. Jelinek, S. Andersson, C.A. Slaughter, D.W. Russell, Cloning and regulation of cholesterol 7  $\alpha$ -hydroxylase, the rate-limiting enzyme in bile acid biosynthesis, *Journal of Biological Chemistry*, 265 (1990) 8190–8197.
- [349] M. Schwarz, E.G. Lund, K.D. Setchell, H.J. Kayden, J.E. Zerwekh, I. Björkhem, J. Herz, D.W. Russell, Disruption of Cholesterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase Gene in Mice II Bile acid deficiency is overcome by induction of Oxysterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase, *Journal of Biological Chemistry*, 271 (1996) 18024–18031.
- [350] H. Rosen, A. Reshef, N. Maeda, A. Lippoldt, S. Shpizen, L. Triger, G. Eggertsen, I. Björkhem, E. Leitersdorf, Markedly reduced bile acid synthesis but maintained levels of cholesterol and vitamin D metabolites in mice with disrupted sterol 27-hydroxylase gene, *Journal of Biological Chemistry*, 273 (1998) 14805–14812.

- [351] J.J. Repa, E.G. Lund, J.D. Horton, E. Leitersdorf, D.W. Russell, J.M. Dietschy, S.D. Turley, Disruption of the sterol 27-hydroxylase gene in mice results in hepatomegaly and hypertriglyceridemia reversal by cholic acid feeding, *Journal of Biological Chemistry*, 275 (2000) 39685–39692.
- [352] D. Keppler, Cholestasis and the role of basolateral efflux pumps, *Zeitschrift Für Gastroenterologie*, 49 (2011) 1553–1557.
- [353] F.J. Cuperus, T. Claudel, J. Gautherot, E. Halilbasic, M. Trauner, The role of canalicular ABC transporters in cholestasis, *Drug Metabolism and Disposition*, 42 (2014) 546–560.
- [354] M. Nitta, S. Ku, C. Brown, A.Y. Okamoto, B. Shan, CPF: an orphan nuclear receptor that regulates liver-specific expression of the human cholesterol-7 $\alpha$ -hydroxylase gene, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 (1999) 6660–6665.
- [355] B. Goodwin, S.A. Jones, R.R. Price, M.A. Watson, D.D. McKee, L.B. Moore, C. Galardi, J.G. Wilson, M.C. Lewis, M.E. Roth, others, A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis, *Molecular Cell*, 6 (2000) 517–526.
- [356] T. Claudel, E. Sturm, H. Duez, I.P. Torra, A. Sirvent, V. Kosykh, J.-C. Fruchart, J. Dallongeville, D.W. Hum, F. Kuipers, others, Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein AI transcription via a negative FXR response element, *The Journal of Clinical Investigation*, 109 (2002) 961–971.
- [357] B.A. Janowski, P.J. Willy, T.R. Devi, J. Falck, D.J. Mangelsdorf, An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR $\alpha$ , *Nature*, 383 (1996) 728.
- [358] B.M. Forman, B. Ruan, J. Chen, G.J. Schroepfer, R.M. Evans, The orphan nuclear receptor LXR $\alpha$  is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94 (1997) 10588–10593.
- [359] Y. Inoue, A.-M. Yu, S.H. Yim, X. Ma, K.W. Krausz, J. Inoue, C.C. Xiang, M.J. Brownstein, G. Eggertsen, I. Björkhem, others, Regulation of bile acid biosynthesis by hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ , *Journal of Lipid Research*, 47 (2006) 215–227.
- [360] E.-J. Rhee, C.D. Byrne, K.-C. Sung, The HDL cholesterol/apolipoprotein AI ratio: an indicator of cardiovascular disease, *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 24 (2017) 148–153.
- [361] N. Woudberg, S. Pedretti, S. Lecour, R. Schulz, N. Vuilleumier, R. James, M.A. Frias, Pharmacological Intervention to Modulate HDL: What Do We Target?, *Frontiers in Pharmacology*, 8 (2017) 989.
- [362] B. Lindenthal, T. Sudhop, P. Schiedermaier, M. Agnan, T. Sauerbruch, K. von Bergmann, Serum plant sterols and biliary cholesterol secretion in humans studies with ursodeoxycholic acid, *Journal of Lipid Research*, 43 (2002) 1072–1077.
- [363] J.H. Miyake, X.-D.T. Doung, W. Strauss, G.L. Moore, L.W. Castellani, L.K. Curtiss, J.M. Taylor, R.A. Davis, Increased production of apolipoprotein B-containing lipoproteins in the absence of hyperlipidemia in transgenic mice expressing cholesterol -7 $\alpha$ -hydroxylase, *Journal of Biological Chemistry*, 276 (2001) 23304–23311.
- [364] J.Y. Chiang, Bile acids: regulation of synthesis, *Journal of Lipid Research*, 50 (2009) 1955–1966.
- [365] L.L. Rudel, R.G. Lee, P. Parini, ACAT2 is a target for treatment of coronary heart disease associated with hypercholesterolemia, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25 (2005) 1112–1118.

- [366] R. Kottkamp, Analyse und Etablierung eines CRISPR/Cas9 vermittelten Abcc6-Knockouts und histochemische Untersuchung des Lebergewebes Abcc6-defizienter Mäuse, (2016).
- [367] J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biology*, 3 (2002) research0034–1.
- [368] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> method, *Methods*, 25 (2001) 402–408.
- [369] F. Sanger, A.R. Coulson, A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase, *Journal of Molecular Biology*, 94 (1975) 441–448.
- [370] J. Lembcke, U. Ceglarek, G.M. Fiedler, S. Baumann, A. Leichtle, J. Thiery, Rapid quantification of free and esterified phytosterols in human serum using APPI-LC-MS/MS, *Journal of Lipid Research*, 46 (2005) 21–26.
- [371] U. Ceglarek, J. Dittrich, S. Becker, F. Baumann, L. Kortz, J. Thiery, Quantification of seven apolipoproteins in human plasma by proteotypic peptides using fast LC-MS/MS, *PROTEOMICS-Clinical Applications*, 7 (2013) 794–801.
- [372] S. Becker, S. Röhnike, S. Empting, D. Haas, K. Mohnike, S. Beblo, U. Mütze, R. Husain, J. Thiery, U. Ceglarek, LC-MS/MS-based quantification of cholesterol and related metabolites in dried blood for the screening of inborn errors of sterol metabolism, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407 (2015) 5227–5233.

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Symptome der Haut von PXE-Patienten.....	4
Abbildung 2: Veränderungen der Retina bei PXE..	4
Abbildung 3: Paraffinschnitte der Niere und des Auges einer 17 Monate alten Abcc6-defizienten Maus.....	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Cholesterinbiosynthese.....	9
Abbildung 5: Schematische Darstellung der intestinalen Cholesterinabsorption und der Cholesterinverteilung über das Blut zur Leber.....	11
Abbildung 6. Schematische Darstellung des reversen Cholesterintransports.....	12
Abbildung 7: Alizarin-Rot-Färbung der Vibrissenkapseln einer 12 Monate alten Abcc6-defizienten Maus und die <i>Western-Blot</i> -Analyse der Abcc6-Proteinexpression im Lebergewebe.....	20
Abbildung 8: Quantifizierung der Konzentration des freien, des veresterten und des gesamten Cholesterins im Serum 6 Monate und 12 Monate alter Mäuse..	21
Abbildung 9: Konzentrationsbestimmung der Cholesterinvorläufer Lanosterin und Desmosterin im Serum 6 Monate und 12 Monate alter Mäuse..	22
Abbildung 10: Bestimmung der Cholesterinkonzentration der HDL- und LDL/VLDL-Partikel sowie Quantifizierung des oxidierten LDL-Cholesterins im Serum 6 Monate und 12 Monate alter Mäuse.....	23
Abbildung 11: Quantifizierung der Phytosterinkonzentrationen im Serum 6 Monate alter Mäuse.....	25
Abbildung 12: Quantifizierung der Phytosterinkonzentrationen im Serum 12 Monate alter Mäuse.....	26
Abbildung 13: Verifikation der <i>PCR-Array</i> -Analyse im Leber-, Nieren- und weißen Fettgewebe 12 Monate alter Mäuse mittels quantitativer <i>real-time</i> PCR.....	34
Abbildung 14: Genexpressionsanalyse der Cholesterinbiosynthese des Lebergewebes 6 Monate und 12 Monate alter Mäuse..	36
Abbildung 15: Genexpressionsanalyse der Apolipoproteine des Lebergewebes 6 Monate und 12 Monate alter Mäuse.....	38
Abbildung 16: Quantifizierung der Apolipoprotein-Konzentrationen im Serum 6 Monate alter Mäuse.....	39
Abbildung 17: Quantifizierung der Apolipoprotein-Konzentrationen im Serum 12 Monate alter Mäuse.....	40
Abbildung 18: Genexpressionsanalyse der Transkriptionsfaktoren im Lebergewebe 12 Monate alter Mäuse.....	41

Abbildung 19: Genexpressionsanalyse der lipoprotein-metabolisierenden Proteinen des Lebergewebes 12 Monate alter Mäuse und Bestimmung der Lcat-Aktivität im Serum 6 Monate und 12 Monate alter Mäuse..	42
Abbildung 20: Genexpressionsanalyse der Lipoproteinlipase und der hepatischen Lipase im Lebergewebe und Bestimmung der Lpl-Proteinkonzentration im Serum 6 Monate und 12 Monate alter Mäuse.....	43
Abbildung 21: Genexpressionsanalyse von Pcsk9 und des LDL-Rezeptors im Lebergewebe und Bestimmung der Pcsk9-Proteinkonzentration im Serum 6 Monate und 12 Monate alter Mäuse.....	45
Abbildung 22: Genexpressionsanalyse von <i>Cyp7a1</i> und <i>Cyp27a1</i> sowie Bestimmung der Cyp27a1-Proteinkonzentration im Lebergewebe 6 Monate und 12 Monate alter Mäuse...	46
Abbildung 23: Genexpressionsanalyse der ABC-Transporter in metabolisch aktiven Geweben 6 Monate alter Mäuse..	48
Abbildung 24: Genexpressionsanalyse der ABC-Transporter in metabolisch aktiven Gewebe 12 Monate alter Mäuse..	51
Abbildung 25: Hypothetisches Modell der Alteration der Cholesterinhomöostase bei einer Abcc6-Defizienz im Mausmodell. ....	54
Abbildung 26: Nachweis der PCR-Amplifikate zur Abcc6-Genotypbestimmung im analytischen Agarosegel.....	83
Abbildung 27: Temperaturprofil der qPCR. ....	87
Abbildung 28: Temperaturprofil des RT <sup>2</sup> Profiler-PCR-Arrays. ....	91

## 10 Publikationen und Präsentationen

### **PUBLIKATIONEN IN PEER-REVIEW ZEITSCHRIFTEN**

---

S.Hinderer, M. Schesny, A. Bayrak, **B. Ibold**, M. Hampel, T. Walles, U.A. Stock, M. Seifert, K. Schenke-Layland. Engineering of fibrillar decorin matrices for a tissue-engineered trachea. Biomaterials. 2012 Jul;33(21):5259-66.

I. Faust, E. Donhauser, B. Fischer, **B. Ibold**, J. Kuhn, C. Knabbe, D. Hendig. Characterization of dermal myofibroblast differentiation in pseudoxanthoma elasticum. Exp Cell Res. 2017 Nov;360(2):153-162.

**B. Ibold**, I. Faust, J. Tiemann, T. Gorgels, A. Bergen, C. Knabbe, D. Hendig. Abcc6 deficiency in mice leads to altered ABC transporter gene expression in metabolic active tissues. (Manuskript eingereicht)

**B. Ibold**, U. Ceglarek, J. Dittrich, B. Zögner, I. Faust, J. Tiemann, T. Gorgels, A. Bergen, C. Knabbe, D. Hendig. Genetic deletion of Abcc6 disturbs cholesterol homeostasis in mice. (Manuskript in Vorbereitung)

### **KONGRESSBEITRÄGE & POSTERPRÄSENTATIONEN**

---

**B. Ibold**, A. Bayrak, S. Hinderer, K. Schenke-Layland, U.A. Stock, M. Seifert. (2012) 3<sup>rd</sup> International Conference on Strategies in Tissue Engineering; Würzburg, Deutschland. Präsentation: Immunological in vitro characterization of xenogeneic extracellular matrix proteins for novel electrospun matrices in cardiovascular tissue-engineering.

**B. Ibold**, P. Kuzaj, R. Kottkamp, I. Faust, J. Kuhn, C. Knabbe, D. Hendig. (2016) 13. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL), Mannheim, Deutschland. Posterpräsentation: ABCC6 deficiency in liver induces cholesterol biosynthesis in peripheral tissue.

**B. Ibold**, U. Ceglarek, J. Dittrich, B. Zögner, T. Gorgels, A. Bergen, I. Faust, J. Tiemann, C. Knabbe, D. Hendig (2017) 14. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL), Mannheim, Deutschland. Posterpräsentation: ABCC6 knockout in mice is associated with disturbed cholesterol and lipoprotein metabolism.



## 12 Anhang

### 12.1 RT<sup>2</sup> Profiler-PCR-Array Daten

#### 12.1.1 Lebergewebe

**Tabelle 17: RT<sup>2</sup> Profiler-PCR-Array Datenset des Lebergewebes zur Analyse verschiedener Gene der Cholesterinbiosynthese und des Lipoproteinstoffwechsels**

Genname	Abkürzung	Fold-Change <sup>1</sup>	Kommentar <sup>2</sup>	Mittelwert C <sub>T</sub> Wt	Mittelwert C <sub>T</sub> Abcc6 <sup>-/-</sup>
ATP-Bindungskassetten-Transporter, Unterfamilie A, Mitglied 3	Abca1	0,85	*	24,79	25,51
ATP-Bindungskassetten-Transporter, Unterfamilie A, Mitglied 2	Abca2	0,76	*	28,12	29,00
ATP-Bindungskassetten-Transporter, Unterfamilie G, Mitglied 1	Abcg1	0,84	A	29,74	30,49
Acetyl-Coenzym A-Acyltransferase 2	Acaa2	0,96	*	20,10	20,65
Aldo-Keto-Reduktase Familie 1, Mitglied D1	Akr1d1	0,85	*	23,45	24,17
Angiopoietin-ähnliches Protein 3	Angptl3	1,39	*	26,86	26,88
Ankyrin-Wiederholungspolypeptid 2, Familie A	Ankrd2	28,77	A	30,99	26,63
Apolipoprotein A-I	Apoa1	1,12	*	13,24	13,57
Apolipoprotein A-II	Apoa2	0,95	*	13,92	14,49
Apolipoprotein A-IV	Apoa4	1,02	*	20,53	21,00
Apolipoprotein B	ApoB	0,91	*	18,93	19,55
Apolipoprotein C-III	ApoC3	0,91	*	14,89	15,52
Apolipoprotein D	ApoD	0,04	A	29,92	35,00
Apolipoprotein E	ApoE	1,14	*	15,90	16,20
Apolipoprotein F	ApoF	1,15	*	19,36	19,66
Apolipoprotein L 8	ApoL8	2,21	B	35,00	34,35
Cadherin 13	Cdh13	0,52	A	29,01	30,45
Carboxylesterlipase	Cel	0,09	B	31,03	35,00
Chymotrypsin-ähnliche Elastasefamilie, Mitglied 3B	Cela3b	0,13	B	31,62	35,00
Zelluläres Nukleinsäure-Bindeprotein	Cnbp	0,87	*	20,44	21,14
Collectin Unterfamilie Mitglied 12	Colec12	0,93	*	24,55	25,15
C-reaktives Protein	Crp	0,80	*	20,97	21,78
Chemokin (C-X-C Motiv) -Ligand 16	Cxcl16	1,33	*	26,47	26,55
Cytochrom-b5-Reduktase 3	Cyb5r3	0,90	*	22,25	22,89
Cholesterin-Seitenketten-Spaltungsenzym, mitochondrial	Cyp11a1	0,74	B	33,95	34,87
24-Hydroxycholesterin-7 $\alpha$ -Hydroxylase	Cyp39a1	1,31	*	26,19	26,29
Cholesterin-24-Hydroxylase	Cyp46a1	0,94	B	31,55	32,13
Lanosterin-14 $\alpha$ -Demethylase	Cyp51	1,00	*	21,62	22,11
Cholesterin-7 $\alpha$ -Monooxygenase	Cyp7a1	1,11	*	23,62	23,95
25-Hydroxycholesterin-7 $\alpha$ -Hydroxylase	Cyp7b1	0,64	*	22,53	23,66
24-Dehydrocholesterin-Reduktase	Dhcr24	1,05	*	23,15	23,57
7-Dehydrocholesterin-Reduktase	Dhcr7	1,27	*	26,45	26,60
Phenylalkylamin Ca <sup>2+</sup> -Antagonist (emopamil)-Bindeprotein	Ebp	1,13	*	20,78	21,09
Squalensynthase	Fdft1	0,96	*	21,44	22,00
Farnesylpyrophosphat synthase	Fdps	0,87	*	19,09	19,78
High-density lipoprotein (HDL)-Bindeprotein	Hdlbp	0,95	*	23,09	23,65
3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase	Hmgcr	0,72	*	22,64	23,61
3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Synthase 1	Hmgcs1	1,29	*	21,91	22,04
3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Synthase 2	Hmgcs2	0,79	*	17,66	18,5
Isopentenylidiphosphat- $\delta$ -Isomerase	Idi1	1,11	*	21,37	21,70
Isopentenyl-diphosphat- $\delta$ -Isomerase 2	Idi2	0,56	B	33,30	34,64
Interleukin 4	Il4	1,66	B	32,97	32,73
Insulin-induziertes Gen 1	Insig1	1,07	*	23,10	23,49
Insulin-induziertes Gen 2	Insig2	0,89	*	22,41	23,08
Phosphatidylcholin-Sterol-Acyltransferase	Lcat	0,99	*	20,46	20,97
Low-density lipoprotein Rezeptor	Ldlr	0,67	*	24,78	25,86
Low-density lipoprotein Rezeptor Adaptorprotein 1	Ldlrap1	0,84	*	27,32	28,06
Leptin	Lep	1,41	C	35,00	35,00
Lipase, hormonsensitive	Lipe	0,76	A	29,52	30,42
Low-density lipoprotein Rezeptor-bezogenes Protein 10	Lrp10	2,02	*	28,26	27,74
Low-density lipoprotein Rezeptor-bezogenes Protein 12	Lrp12	1,15	A	29,73	30,03
Low-density lipoprotein Rezeptor-bezogenes Protein 1B	Lrp1b	1,41	C	35,00	35,00

Low-density lipoprotein Rezeptor-bezogenes Protein 6	Lrp6	1,05	*	24,10	24,53
Low-density lipoprotein Rezeptor-bezogenes Protein; assoziiertes Protein 1	Lrpap1	0,84	*	23,08	23,82
Membran-gebundene Transkriptionfaktor-Peptidase, Seite 1	Mbtps1	1,01	*	24,99	25,47
Mevalonat-diphospho-Decarboxylase	Mvd	0,80	*	26,21	27,02
Mevalonatkinase	Mvk	1,35	*	25,95	26,01
NPC1-ähnliches Protein 1	Npc1l1	2,45	B	35,00	34,2
Nukleärer Rezeptor Unterfamilie 0, Gruppe B, Mitglied 2	Nr0b2	1,06	*	24,37	24,78
Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor $\beta$	Nr1c2	0,60	*	28,47	29,69
Gallensäure-Rezeptor (FXR $\alpha$ )	Nr1h4	0,86	*	20,91	21,61
NAD(P)-abhängige Steroid-Dehydrogenase-ähnliches Protein	Nsdhl	1,02	*	23,72	24,19
Oxidierter low-density lipoprotein Rezeptor 1	Olr1	0,80	B	34,19	35,00
Oxysterin-Bindeprotein-ähnliches 1A	Osbpl1a	1,00	*	22,08	22,57
Oxysterin-Bindeprotein-ähnliches 5	Osbpl5	0,90	B	30,16	30,80
Proteinkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9	Pcsk9	1,29	*	27,48	27,60
Phosphomevalonatkinase	Pmvk	1,01	*	22,75	23,23
Proteinkinase, AMP-aktiviert, $\alpha$ 1 katalytische Untereinheit	Prkaa1	1,21	*	26,58	26,80
Proteinkinase, AMP-aktiviert, $\alpha$ 2 katalytische Untereinheit	Prkaa2	0,87	*	24,81	25,51
Proteinkinase, AMP-aktiviert, $\gamma$ 2 nicht-katalytische Untereinheit	Prkag2	0,92	*	24,49	25,09
SREBF-Chaperon	Scap	1,30	*	22,11	22,22
Scavenger-Rezeptor Klasse F, Mitglied 1	Scarf1	1,20	*	29,45	29,68
Sortierungsnexin 17	Snx17	1,11	*	27,36	27,69
Sterol-O-Acyltransferase 1	Soat1	1,09	*	28,83	29,20
Sterol-O-Acyltransferase 2	Soat2	0,96	*	25,11	25,67
Sortilin-bezogener Rezeptor 1	Sorl1	0,48	B	30,09	31,65
Sterolregulationselement 1	Srebf1	1,02	*	22,18	22,65
Sterolregulationselement 2	Srebf2	1,22	*	26,00	26,20
Stabilin 1	Stab1	1,16	*	24,60	24,88
Stabilin 2	Stab2	1,03	*	26,81	27,27
START-Domäne enthaltendes Protein 3	Stard3	1,19	*	28,15	28,39
Transmembran 7 Superfamilie Mitglied 2	Tm7sf2	0,98	*	23,52	24,04
Transcriptions-Regulationsfaktor 1	Trerf1	0,91	B	31,94	32,58
Very-low-density lipoprotein Rezeptor	Vldlr	0,59	*	25,85	27,11
Aktin, $\beta$	Actb	1,05	*	21,46	21,88
Beta-2-Mikroglobulin	B2m	0,82	*	15,84	16,62
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	Gapdh	0,99	*	21,43	21,93
Glucuronidase, $\beta$	Gusb	0,96	*	24,78	25,33
Hitzeschockprotein 90 $\alpha$ , Klasse B Mitglied 1	Hsp90ab1	0,90	*	19,63	20,27

- Der Expressionsunterschied (*Fold-Change*) ( $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ ) ist die normalisierte Genexpressionsrate ( $2^{(-\Delta C_T)}$ ) der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Probe geteilt durch die normalisierte Genexpressionsrate ( $2^{(-\Delta C_T)}$ ) der Wt-Probe.
- \*: Der gemittelte  $C_T$ -Wert liegt in beiden Proben (Wt oder *Abcc6*<sup>-/-</sup>) unter 30.
  - Der gemittelte  $C_T$ -Wert ist hoch (> 30) in einer der Proben (Wt oder *Abcc6*<sup>-/-</sup>) und verhältnismäßig gering in der anderen Probe (< 30).
  - Der gemittelte  $C_T$ -Wert ist hoch (> 30) in beiden Proben (Wt oder *Abcc6*<sup>-/-</sup>) und das relative Expressionslevel ist in beiden Proben gering.
  - Der gemittelte  $C_T$ -Wert ist entweder nicht bestimmbar oder höher als der *Cut-Off*-Wert ( $C_T$ -Wert 35) in beiden Proben (Wt oder *Abcc6*<sup>-/-</sup>) und eine Expression somit nicht detektierbar war.

## 12.1.2 Nierengewebe

**Tabelle 18: RT<sup>2</sup> Profiler-PCR-Array Datenset des Nierengewebes zur Analyse verschiedener Gene der Cholesterinbiosynthese und des Lipoproteinstoffwechsels**

Genname	Abkürzung	<i>Fold Change</i> <sup>1</sup>	Kommentar <sup>2</sup>	Mittelwert $C_T$ Wt	Mittelwert $C_T$ <i>Abcc6</i> <sup>-/-</sup>
ATP-Bindungskassetten-Transporter, Unterfamilie A, Mitglied 3	Abca1	0,70	C	35,00	35,00
ATP-Bindungskassetten-Transporter, Unterfamilie A,	Abca2	0,81	*	25,19	24,98

Mitglied 2					
ATP-Bindungskassetten-Transporter, Unterfamilie G, Mitglied 1	Abcg1	0,76	*	26,47	26,35
Acetyl-Coenzym A-Acyltransferase 2	Acaa2	0,87	*	20,89	20,58
Aldo-Keto-Reduktase Familie 1, Mitglied D1	Akr1d1	1,00	*	23,72	23,21
Angiopoietin-ähnliches Protein 3	Angptl3	1,13	*	25,18	24,49
Ankyrin-Wiederholungsprotein 2, Familie A	Ankra2	0,76	*	24,19	24,07
Apolipoprotein A-I	Apoa1	2,23	*	24,12	22,45
Apolipoprotein A-II	Apoa2	1,53	*	23,29	22,17
Apolipoprotein A-IV	Apoa4	0,88	*	26,29	25,96
Apolipoprotein B	Apob	0,84	*	20,59	20,33
Apolipoprotein C-III	Apoc3	0,85	*	22,81	22,54
Apolipoprotein D	Apod	0,35	*	27,06	28,04
Apolipoprotein E	Apoe	1,05	*	20,59	20,01
Apolipoprotein F	Apof	2,81	A	30,27	28,27
Apolipoprotein L 8	Apol8	1,71	B	32,38	31,09
Cadherin 13	Cdh13	0,63	*	26,24	26,40
Carboxylesterlipase	Cel	0,16	B	32,90	35,00
Chymotrypsin-ähnliche Elastasefamilie, Mitglied 3B	Cela3b	0,39	B	33,53	34,38
Zelluläres Nukleinsäure-Bindeprotein	Cnbp	0,90	*	20,05	19,69
Collectin Unterfamilie Mitglied 12	Colec12	1,39	*	25,35	24,36
C-reaktives Protein	Crp	2,35	A	30,23	28,49
Chemokin (C-X-C Motiv) -Ligand 16	Cxcl16	1,19	*	22,98	22,22
Cytochrom-b5-Reduktase 3	Cyb5r3	0,74	*	21,81	21,74
Cholesterin-Seitenketten-Spaltungsenzym, mitochondrial	Cyp11a1	0,02	B	30,15	35,00
24-Hydroxycholesterin-7 $\alpha$ -Hydroxylase	Cyp39a1	0,92	*	26,04	25,65
Cholesterin-24-Hydroxylase	Cyp46a1	0,87	*	28,48	28,17
Lanosterin-14 $\alpha$ -Demethylase	Cyp51	0,94	*	20,61	20,19
Cholesterin-7 $\alpha$ -Monooxygenase	Cyp7a1	9,95	A	33,59	29,77
25-Hydroxycholesterin-7 $\alpha$ -Hydroxylase	Cyp7b1	0,87	*	24,36	24,05
24-Dehydrocholesterin-Reduktase	Dhcr24	1,05	*	22,16	21,57
7-Dehydrocholesterin-Reduktase	Dhcr7	0,94	*	26,06	25,65
Phenylalkylamin Ca <sup>2+</sup> Antagonist (emopamil)-Bindeprotein	Ebp	0,70	*	21,56	21,57
Squalensynthase	Fdft1	0,91	*	23,01	22,63
Farnesylpyrophosphatsynthase	Fdps	1,03	*	23,34	22,78
High-density lipoprotein (HDL)-Bindeprotein	Hdlbp	0,75	*	21,71	21,62
3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase	Hmgcr	0,50	*	22,74	23,22
3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Synthase 1	Hmgcs1	0,74	*	19,94	19,86
3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Synthase 2	Hmgcs2	1,96	*	23,15	21,67
Isopentenyl-diphosphat- $\delta$ -Isomerase	Idi1	0,91	*	22,00	21,62
Isopentenyl-diphosphate- $\delta$ -Isomerase 2	Idi2	0,71	B	30,56	30,54
Interleukin 4	Il4	0,48	B	30,61	31,17
Insulin-induziertes Gen 1	Insig1	1,01	*	24,54	24,01
Insulin-induziertes Gen 2	Insig2	0,92	*	23,59	23,20
Phosphatidylcholin-Sterol-Acyltransferase	Lcat	1,52	*	28,20	27,09
Low-density lipoprotein Rezeptor	Ldlr	0,95	*	25,52	25,08
Low-density lipoprotein Rezeptor Adaptorprotein 1	Ldlrap1	1,05	*	25,61	25,02
Leptin	Lep	0,11	A	29,61	32,31
Lipase, hormonsensitive	Lipe	0,73	*	25,70	25,64
Low-density lipoprotein Rezeptor-bezogenes Protein 10	Lrp10	0,70	*	23,11	23,11
Low-density lipoprotein Rezeptor-bezogenes Protein 12	Lrp12	1,01	*	26,08	25,56
Low-density lipoprotein Rezeptor-bezogenes Protein 1B	Lrp1b	0,66	B	33,86	33,95
Low-density lipoprotein Rezeptor-bezogenes Protein 6	Lrp6	0,88	*	21,15	20,83
Low-density lipoprotein Rezeptor-bezogenes Protein; assoziiertes Protein 1	Lrpap1	0,70	*	18,72	18,72
Membran-gebundene Transkriptionfaktor-Peptidase, Seite 1	Mbtps1	0,75	*	23,09	23,00
Mevalonat-diphospho-Decarboxylase	Mvd	0,72	*	24,52	24,49
Mevalonatkinase	Mvk	0,88	*	25,59	25,26
NPC1-ähnliches Protein 1	Npc1l1	0,95	B	31,99	31,56
Nukleärer Rezeptor Unterfamilie 0, Gruppe B, Mitglied 2	Nr0b2	0,85	*	27,27	26,99
Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor $\beta$	Nr1c2	0,47	*	24,12	24,71
Gallensäure-Rezeptor	Nr1h4	0,60	*	20,59	20,82
NAD(P)-abhängige Steroid-Dehydrogenase-ähnliches Protein	Nsdhl	0,70	*	22,63	22,65
Oxidierter low-density lipoprotein Rezeptor 1	Olr1	1,30	B	31,62	30,73
Oxysterin-Bindeprotein-ähnliches 1A	Osbpl1a	0,95	*	22,25	21,82
Oxysterin-Bindeprotein-ähnliches 5	Osbpl5	0,94	*	24,54	24,12
Proprotein-konvertase Subtilisin/Kexin Typ 9	Pcsk9	0,62	*	27,57	27,75
Phosphomevalonatkinase	Pmvk	0,71	*	24,23	24,21
Proteinkinase, AMP-aktiviert, $\alpha$ 1 katalytische	Prkaa1	0,96	*	24,59	24,14

Untereinheit					
Proteinkinase, AMP-aktiviert, α2 katalytische Untereinheit	Prkaa2	0,90	*	21,48	21,12
Proteinkinase, AMP-aktiviert, γ2 nicht-katalytische Untereinheit	Prkag2	0,92	*	22,85	22,46
SREBF-Chaperon	Scap	0,67	*	21,64	21,72
Scavenger-Rezeptor Klasse F, Mitglied 1	Scarf1	1,05	*	26,90	26,32
Sortierungs nexin 17	Snx17	0,66	*	23,12	23,21
Sterol-O-Acyltransferase 1	Soat1	0,77	*	24,54	24,40
Sterol-O-Acyltransferase 2	Soat2	1,27	B	31,02	30,17
Sortilin-bezogener Rezeptor 1	Sorl1	0,84	*	23,33	23,07
Sterolregulationselement 1	Srebf1	0,73	*	23,61	23,56
Sterolregulationselement 2	Srebf2	0,02	*	23,28	28,8
Stabilin 1	Stab1	0,61	*	24,91	25,11
Stabilin 2	Stab2	1,37	*	28,29	27,33
START-Domäne enthaltendes Protein 3	Stard3	0,75	*	25,55	25,46
Transmembran 7 Superfamilie Mitglied 2	Tm7sf2	0,99	*	25,30	24,81
Transcriptions-Regulationsfaktor 1	Trerf1	0,93	*	26,24	25,83
Very-low-density lipoprotein Rezeptor	Vldlr	0,79	*	21,74	21,57
Aktin, beta	Actb	0,98	*	18,77	18,29
Beta-2-Mikroglobulin	B2m	0,50	*	17,38	17,86
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	Gapdh	1,13	*	18,27	17,58
Glucuronidase, beta	Gusb	0,90	*	23,23	22,87
Hitzeschockprotein 90α, Klasse B Mitglied 1	Hsp90ab1	0,79	*	18,59	18,41

- 1: Der Expressionsunterschied (*Fold-Change*) ( $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ ) ist die normalisierte Genexpressionsrate ( $2^{(-\Delta C_T)}$ ) der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Probe geteilt durch die normalisierte Genexpressionsrate ( $2^{(-\Delta C_T)}$ ) der Wt-Probe.
- 2: \*: Der gemittelte  $C_T$ -Wert liegt in beiden Proben (Wt oder *Abcc6*<sup>-/-</sup>) unter 30.
- A: Der gemittelte  $C_T$ -Wert ist hoch (> 30) in einer der Proben (Wt oder *Abcc6*<sup>-/-</sup>) und verhältnismäßig gering in der anderen Probe (< 30).
- B: Der gemittelte  $C_T$ -Wert ist hoch (> 30) in beiden Proben (Wt oder *Abcc6*<sup>-/-</sup>) und das relative Expressionslevel ist in beiden Proben gering.
- C: Der gemittelte  $C_T$ -Wert ist entweder nicht bestimmbar oder höher als der *Cut-Off*-Wert ( $C_T$ -Wert 35) in beiden Proben (Wt oder *Abcc6*<sup>-/-</sup>) und eine Expression somit nicht detektierbar war.

### 12.1.3 Weißes Fettgewebe

**Tabelle 19: RT<sup>2</sup> Profiler-PCR-Array Datenset des weißen Fettgewebes zur Analyse verschiedener Gene der Cholesterinbiosynthese und des Lipoproteinstoffwechsels**

Genname	Abkürzung	<i>Fold-Change</i> <sup>1</sup>	Kommentar <sup>2</sup>	Mittelwert $C_T$ Wt	Mittelwert $C_T$ <i>Abcc6</i> <sup>-/-</sup>
ATP-Bindungskassetten-Transporter, Unterfamilie A, Mitglied 3	Abca1	1,03	C	35,00	35,00
ATP-Bindungskassetten-Transporter, Unterfamilie A, Mitglied 2	Abca2	0,77	*	24,23	24,66
ATP-Bindungskassetten-Transporter, Unterfamilie G, Mitglied 1	Abcg1	1,22	*	25,34	25,11
Acetyl-Coenzym A-Acyltransferase 2	Acaa2	0,86	*	21,50	21,76
Aldo-Keto-Reduktase Familie 1, Mitglied D1	Akr1d1	0,14	B	30,64	33,56
Angiopietin-ähnliches Protein 3	Angptl3	1,34	*	25,34	24,97
Ankyrin-Wiederholung, Familie A Protein 2	Ankra2	0,02	*	23,93	29,65
Apolipoprotein A-I	Apoa1	6,60	*	28,66	25,98
Apolipoprotein A-II	Apoa2	0,17	*	23,74	26,37
Apolipoprotein A-IV	Apoa4	0,02	A	25,85	31,28
Apolipoprotein B	Apob	0,22	*	27,14	29,40
Apolipoprotein C-III	Apoc3	0,33	*	23,77	25,41
Apolipoprotein D	Apod	1,02	*	22,91	22,92
Apolipoprotein E	Apoe	1,30	*	17,65	17,32
Apolipoprotein F	Apof	0,07	A	27,58	31,43
Apolipoprotein L 8	Apol8	1,74	B	31,69	30,93
Cadherin 13	Cdh13	1,28	*	24,59	24,28
Carboxylesterlipase	Cel	10,35	B	35,00	31,68

Chymotrypsin-ähnliche Elastasefamilie, Mitglied 3B	Cela3b	0,39	B	30,72	32,11
Zelluläres Nukleinsäure-Bindeprotein	Cnbp	0,87	*	19,38	19,64
Collectin Unterfamilie Mitglied 12	Colec12	0,92	*	23,05	23,21
C-reaktives Protein	Crp	0,30	A	29,58	31,38
Chemokin (C-X-C Motiv) -Ligand 16	Cxcl16	1,15	*	24,00	23,85
Cytochrom-b5-Reduktase 3	Cyb5r3	1,15	*	21,60	21,45
Cholesterin-Seitenketten-Spaltungsenzym, mitochondrial	Cyp11a1	0,01	A	25,12	31,77
24-Hydroxycholesterin-7 $\alpha$ -Hydroxylase	Cyp39a1	0,67	*	26,14	26,76
Cholesterin-24-Hydroxylase	Cyp46a1	0,43	A	28,79	30,07
Lanosterin-14 $\alpha$ -Demethylase	Cyp51	0,73	*	22,13	22,62
Cholesterin-7 $\alpha$ -Monooxygenase	Cyp7a1	0,06	B	30,89	35,00
25-Hydroxycholesterin-7 $\alpha$ -Hydroxylase	Cyp7b1	0,60	*	26,65	27,43
24-Dehydrocholesterin-Reduktase	Dhcr24	0,67	*	25,33	25,95
7-Dehydrocholesterin-Reduktase	Dhcr7	0,57	*	25,36	26,22
Phenylalkylamin Ca2+ Antagonist (emopamil)-Bindeprotein	Ebp	0,99	*	22,61	22,68
Squalensynthase	Fdft1	0,98	*	21,62	21,7
Farnesylpyrophosphatsynthase	Fdps	0,53	*	21,09	22,06
High-density lipoprotein (HDL)-Bindeprotein	Hdlbp	0,98	*	21,81	21,89
3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase	Hmgcr	0,41	*	23,77	25,12
3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Synthase 1	Hmgcs1	1,18	*	21,37	21,18
3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Synthase 2	Hmgcs2	0,34	*	21,52	23,12
Isopentenyl-diphosphat- $\delta$ -Isomerase	Idi1	0,69	*	22,18	22,76
Isopentenyl-diphosphate- $\delta$ -Isomerase 2	Idi2	0,82	B	30,47	30,81
Interleukin 4	Il4	0,91	*	28,94	29,13
Insulin-induziertes Gen 1	Insig1	1,98	*	22,75	21,81
Insulin-induziertes Gen 2	Insig2	1,69	*	23,50	22,79
Phosphatidylcholin-Sterol-Acyltransferase	Lcat	0,81	*	27,49	27,83
Low-density lipoprotein Rezeptor	Ldlr	0,53	*	24,61	25,57
Low-density lipoprotein Rezeptor Adaptorprotein 1	Ldlrap1	1,21	*	25,99	25,77
Leptin	Lep	1,19	*	21,84	21,63
Lipase, hormonsensitive	Lipe	1,11	*	20,65	20,54
Low-density lipoprotein Rezeptor-bezogenes Protein 10	Lrp10	0,80	*	24,13	24,50
Low-density lipoprotein Rezeptor-bezogenes Protein 12	Lrp12	0,98	*	26,10	26,18
Low-density lipoprotein Rezeptor-bezogenes Protein 1B	Lrp1b	1,03	C	35,00	35,00
Low-density lipoprotein Rezeptor-bezogenes Protein 6	Lrp6	1,16	*	21,76	21,60
Low-density lipoprotein Rezeptor-bezogenes Protein; assoziiertes Protein 1	Lrpap1	1,17	*	20,69	20,51
Membran-gebundene Transkriptionfaktor-Peptidase, Seite 1	Mbtps1	0,72	*	22,86	23,38
Mevalonat-diphospho-Decarboxylase	Mvd	1,19	*	26,20	25,99
Mevalonatkinase	Mvk	1,12	*	24,63	24,52
NPC1-ähnliches Protein 1	Npc1l1	0,45	B	30,28	31,47
Nukleärer Rezeptor Unterfamilie 0, Gruppe B, Mitglied 2	Nr0b2	0,03	A	28,92	34,19
Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor $\beta$	Nr1c2	1,67	*	25,52	24,83
Gallensäure-Rezeptor	Nr1h4	0,40	*	25,95	27,31
NAD(P)-abhängige Steroid-Dehydrogenase-ähnliches Protein	Nsdhl	1,23	*	22,81	22,55
Oxidierter low-density lipoprotein Rezeptor 1	Olr1	1,85	B	31,17	30,33
Oxysterin-Bindeprotein-ähnliches 1A	Osbpl1a	1,17	*	22,68	22,50
Oxysterin-Bindeprotein-ähnliches 5	Osbpl5	1,11	*	25,20	25,09
Proteininkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9	Pcsk9	0,60	*	28,83	29,63
Phosphomevalonatkinase	Pmvk	1,34	*	22,66	22,28
Proteinkinase, AMP-aktiviert, $\alpha$ 1 katalytische Untereinheit	Prkaa1	1,27	*	23,72	23,43
Proteinkinase, AMP-aktiviert, $\alpha$ 2 katalytische Untereinheit	Prkaa2	1,01	*	25,04	25,07
Proteinkinase, AMP-aktiviert, $\gamma$ 2 nicht-katalytische Untereinheit	Prkag2	0,99	*	22,59	22,65
SREBF-Chaperon	Scap	0,62	*	22,07	22,79
Scavenger-Rezeptor Klasse F, Mitglied 1	Scarf1	1,34	*	27,03	26,65
Sortierungsnexin 17	Snx17	1,02	*	23,57	23,58
Sterol-O-Acyltransferase 1	Soat1	0,21	*	23,00	25,29
Sterol-O-Acyltransferase 2	Soat2	0,40	A	29,40	30,78
Sortilin-bezogener Rezeptor 1	Sorl1	1,87	*	24,93	24,08
Sterolregulationselement 1	Srebf1	1,46	*	21,37	20,87
Sterolregulationselement 2	Srebf2	0,64	*	23,51	24,20
Stabilin 1	Stab1	0,92	*	23,20	23,36
Stabilin 2	Stab2	0,63	A	29,33	30,05

START-Domäne enthaltendes Protein 3	Stard3	0,63	*	25,82	26,53
Transmembran 7 Superfamilie Mitglied 2	Tm7sf2	1,15	*	25,23	25,07
Transcriptions-Regulationsfaktor 1	Trerf1	0,60	*	25,11	25,89
Very-low-density lipoprotein Rezeptor	Vldlr	1,15	*	21,98	21,82
Aktin, beta	Actb	0,94	*	18,05	18,18
Beta-2-Mikroglobulin	B2m	1,37	*	15,56	15,15
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	Gapdh	1,07	*	19,61	19,57
Glucuronidase, beta	Gusb	1,00	*	22,89	22,94
Hitzeschockprotein 90α, Klasse B Mitglied 1	Hsp90ab1	0,89	*	18,82	19,03

- 1: Der Expressionsunterschied (*Fold-Change*) ( $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ ) ist die normalisierte Genexpressionsrate ( $2^{(-\Delta C_T)}$ ) der *Abcc6*<sup>-/-</sup>-Probe geteilt durch die normalisierte Genexpressionsrate ( $2^{(-\Delta C_T)}$ ) der Wt-Probe.
- 2: \*: Der gemittelte  $C_T$ -Wert liegt in beiden Proben (Wt oder *Abcc6*<sup>-/-</sup>) unter 30.
  - A: Der gemittelte  $C_T$ -Wert ist hoch (> 30) in einer der Proben (Wt oder *Abcc6*<sup>-/-</sup>) und verhältnismäßig gering in der anderen Probe (< 30).
  - B: Der gemittelte  $C_T$ -Wert ist hoch (> 30) in beiden Proben (Wt oder *Abcc6*<sup>-/-</sup>) und das relative Expressionslevel ist in beiden Proben gering.
  - C: Der gemittelte  $C_T$ -Wert ist entweder nicht bestimmbar oder höher als der *Cut-Off*-Wert ( $C_T$ -Wert 35) in beiden Proben (Wt oder *Abcc6*<sup>-/-</sup>) und eine Expression somit nicht detektierbar war.

## 13 Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt,

dass ich, Bettina Ibold, die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt und verfasst habe. Ich versichere, dass ich alle Hilfsmittel und benutzten Quellen vollständig angegeben und dass ich alle Stellen, die ich wörtlich oder dem Sinne nach aus anderen Veröffentlichungen entnommen habe, kenntlich gemacht habe.

---

Bielefeld, den 16.04.2018

Bettina Ibold